



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**Institut National Polytechnique de Lorraine
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Laboratoire de Science et de Génie Alimentaires**

THESE

Présentée devant l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Pour obtenir le grade de **Docteur de l'INPL**

Spécialité : **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires**

Par

Mireille SERHAN

Valorisation durable des laits de chèvre de la région du Nord Liban. Transformation en fromage *Darfiyeh* et établissement de caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques en vue de la création d'une appellation d'origine

Soutenue publiquement le 13 Novembre 2008 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

Mme Marie-Christine MONTEL, Directeur de Recherche INRA, Professeur, Aurillac

Mme Marie-Caroline MICHALSKI-VEILLEROT, Chargé de Recherche INRA, HDR, Lyon

Examineurs :

Mme Catherine CAILLIEZ-GRIMAL, HDR, ENSAIA-INPL, Nancy

M. Chadi HOSRI, Chargé de Recherche, USEK, Jounieh, Liban

M. Jacques FANNI, Professeur, Directeur de thèse, ENSAIA-INPL, Nancy

Invités :

Mme Elmira ARAB-TEHRANY, Maître de Conférences, ENSAIA-INPL, Nancy

Depuis toujours, j'ai voulu rêver et voler !

Voici la composition de ces ailes magiques attachées aux bras :

La Volonté de Dieu,
Mes adorables parents Jean & Marie,
Mes 2 sœurs Nathalie & Carole,
Ma princesse Lynn & mon prince Mike,
Les "2J" inséparables Julien & Josette,
Mon Alexandre qui me complète si bien

A vous,
A notre Liban qui naîtra toujours de ses ruines,

Je dédie ce travail

Avant-Propos

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Sciences et de Génie Alimentaires (LSGA) de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA) faisant partie de l'Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL) et aux laboratoires de la Faculté des Sciences Agronomiques (FSA) à l'Université Saint - Esprit de Kaslik (USEK), Liban.

Que tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail, que ce soit professionnellement, financièrement ou moralement, trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Monsieur le Professeur Stéphane DESOBRY, Directeur du LSGA, pour m'avoir permis d'y effectuer ce travail.

Madame Leila GEAGEA, Doyen de la FSA à l'USEK, pour m'avoir facilité l'accès et le travail aux laboratoires de la FSA.

La Fondation René MOAWAD (FRM) au Liban, en sa Présidente Madame Nayla René MOAWAD ; à qui j'exprime toute la reconnaissance et la considération.
Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans le soutien financier du Centre Agricole du Nord à la FRM.

Messieurs FANNI et HOSRI, Professeur à l'ENSAIA et HDR à l'USEK, directeur et co-directeur de cette thèse, pour m'avoir accepté comme leur "dernière" et "première" thésarde. Un grand merci émanant du cœur pour votre soutien scientifique, votre compréhension et votre confiance pour un travail à distance. Ceci a été fondamental dans la bonne réalisation de cette thèse.

Madame Marie-Christine MONTEL, Directeur de Recherche à l'INRA d'Aurillac et Madame Marie-Caroline MICHALSKI-VEILLEROT, Chargé de Recherche à l'INRA de Lyon pour avoir accepté de rapporter sur mon travail.

Madame Catherine CAILLIEZ-GRIMAL, HDR à l'ENSAIA, pour avoir encadré et examiné la partie microbiologique de cette thèse. Un grand merci du cœur pour votre disponibilité quasi immédiate, votre patience et votre extrême gentillesse.

Madame Elmira ARAB-TEHRANY, Maître de Conférences à l'ENSAIA, pour avoir encadré et examiné la partie de transfert de masse de cette thèse. Un grand merci pour m'avoir communiqué votre passion du mécanisme de transfert.

Tous les permanents du LSGA et de la FSA, pour leur sympathie.

Toute ma reconnaissance à toutes ces personnes pour leur disponibilité et leur aide précieuse :

L'équipe de microbiologie alimentaire au LSGA :

Monsieur Jean-Bernard MILLIERE, Professeur à l'ENSAIA, pour toutes vos corrections minutieuses, vos discussions enrichissantes et vos conseils précieux émanant du cœur. Sans oublier la dégustation du *Comté* fruité.

Madame Anne-Marie REVOL, HDR à l'ENSAIA, pour votre soutien et vos recommandations pour la suite des travaux de recherche au Liban.

Monsieur Frédéric BORGES, Maître de Conférences à l'ENSAIA, pour votre aide lors des analyses TTGE.

L'institut Universitaire Technologique (IUT) à Brabois, en la personne de :

Monsieur Gérard BLANCHART, Directeur de l'IUT, pour m'avoir rendu accessible une technique aussi performante que la PCR quantitative.

Monsieur Jean-Yves GRIMAL, Maître de Conférences à l'IUT, pour m'avoir donné la possibilité d'acquérir une première expérience d'enseignement.

Madame Irina IOANNOU, Maître de Conférences à l'ENSAIA, Monsieur Ghassan SROUR, chargé de cours à l'USEK et Monsieur Nicolas NJINTANG, Maître de Conférences à l'Université de NGAOUNDERE au Cameroun, pour m'avoir initié au traitement statistique.

Madames MAUCOURT, JEANDEL, PERROUD, ROGER et THURBAN, pour votre soutien technique et votre disponibilité éloquente.

Mes sincères remerciements à Madame Latifa CHEBIL ALTARSHA, Maître de Conférences à l'ENSAIA qui, depuis mon arrivée à Nancy en 2003, a constitué ma deuxième famille en France.

Mes sincères remerciements à la famille de Monsieur Youssef DOUEIHY, producteur de nos échantillons de *Darfîyeh*, pour votre accueil chaleureux et votre disponibilité tout au long des aventures montagnardes depuis 2005.

Un grand merci pour toutes ces personnes (par ordre alphabétique), qui par leur amitié ou tout simplement par leur présence m'ont accompagné tout au long de cette aventure : *Aboubakar, Agnieszka, Ahlam, Albarin, Ali, Angélica, Anne, Anna Maria, Armand, Atmane, Carine, Carole Hélène, Chantale, Charbel, Claire, Claude, Damien, Elie, Fanny, Guillaume, Hassan, Hilaire, Hilal, Imran, Inam, Ismail, Javeed, Johnny, Jordane, Kassem, Laetitia, Laurette, Leila, Ligia, Lynn, Loretto, Malek, Maryse, Mira, Muhannad, Myriam, Nabila, Pascale, Patricia, Paul, Pierre, Reine, Rim, Rima, Rodrigue, Samah, Sandrine, Suzanna, Tatiana, Vincent, Vincenzo, ...*et toutes les personnes que j'ai oublié de mentionner ...

Aujourd'hui, grâce à vous tous, je tiens dans les mains un petit fruit encore vert, que je ne finirai peut être pas de mûrir ...

Table des matières

1. INTRODUCTION GENERALE	17
2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	24
2.1 Filière caprine au Liban	24
2.1.1 Secteur de l'élevage caprin au Liban	24
2.1.1.1 Contexte	24
2.1.1.2 Caractéristiques des systèmes d'élevage en vigueur au Liban	25
2.1.1.3 Evaluation des besoins	25
2.1.1.4 Forces, faiblesses, opportunités et menaces du secteur caprin	26
2.1.2 Secteur caprin laitier au Liban	28
2.1.2.1 Production et rendement laitier	28
2.1.2.2 Saisonnalité de la production laitière	28
2.1.2.3 Diversité des laits fermentés et des fromages caprins	28
2.1.2.4 Perspectives de protection des produits laitiers	29
2.2 Observations sur l'élevage de la chèvre	30
2.2.1 Historique de la domestication de la chèvre	30
2.2.2 La peau de chèvre	31
2.2.2.1 Structure de la peau	31
2.2.2.2 Composition de la peau	33
2.2.2.3 Propriétés physiques	35
2.2.2.3.1 Effet de l'O ₂ atmosphérique	35
2.2.2.3.2 Effet de l'humidité relative	35
2.2.2.3.3 Effet de la température	36
2.2.2.4 Modes de conservation	36
2.2.2.5 Utilisations de la peau	37
2.3 Observations sur le fromage <i>Darfiyeh</i> et l'Appellation d'Origine (AO)	37
2.3.1 Observations sur le <i>Darfiyeh</i>	38
2.3.1.1 Historique	38
2.3.1.1.1 Origine	38
2.3.1.1.2 Zone de production et pâturages	38
2.3.1.2 Consommation et commercialisation	40
2.3.1.3 Tentatives de sauvegarde	41
2.3.2 Observations sur les Appellations d'Origine (AO)	41
2.3.2.1 Introduction	41
2.3.2.2 Réglementation, importance et enjeux d'une AO	42
2.3.2.2.1 Réglementation et désignation	42
2.3.2.2.2 Importance	42
2.3.2.2.3 Enjeux	43
2.3.2.3 Démarches législatives françaises	43
2.3.2.4 Description d'un fromage bénéficiant d'une AO	44
2.3.2.5 Techniques analytiques pour déterminer l'origine géographique	44
2.4 Interactions aliment-emballage-environnement	46
2.4.1 Introduction	46
2.4.2 Perméation, migration et absorption	46
2.4.3 Aspects théoriques des processus de transfert de matière	49
2.4.3.1 Migration	49
2.4.3.1.1 Coefficient de diffusion	50
2.4.3.1.2 Coefficient de partage	50
2.4.3.2 Sorption et coefficient de solubilité	51
2.4.3.3 Permeabilité et coefficient de permeabilité	51
2.4.4 Sorption des composés par l'emballage	52
2.4.4.1 Mesure du degré de sorption	52
2.4.4.2 Paramètres affectant l'absorption des composés par l'emballage	53
2.4.4.2.1 Conditions environnementales	53

2.4.4.2.2	Propriétés physico-chimiques des molécules diffusantes.....	54
2.4.4.2.3	Matrice alimentaire	55
2.4.4.2.4	Propriétés de l'emballage.....	56
2.5	Affinage des fromages.....	57
2.5.1	Introduction.....	57
2.5.2	Biochimie de l'affinage	57
2.5.2.1	La glycolyse	58
2.5.2.2	La lipolyse et la dégradation des composés lipidiques	59
2.5.2.2.1	Les agents de la lipolyse.....	60
2.5.2.2.2	Le catabolisme des acides gras.....	61
2.5.2.3	La protéolyse et la dégradation des composés protéiques	63
2.5.2.3.1	Les principales enzymes protéolytiques.....	63
2.5.2.3.2	Le catabolisme des acides aminés	64
2.5.3	Microbiologie de l'affinage	66
2.5.3.1	Introduction	66
2.5.3.2	Flore bactérienne associée à l'affinage	66
2.5.3.3	Bactéries lactiques "levains" et "non levains"	67
2.5.3.3.1	Les bactéries lactiques "levains"	67
2.5.3.3.2	Les bactéries lactiques "non levains"	68
2.5.3.4	Complexité et biodiversité de la flore microbienne.....	70
2.5.3.4.1	Fromages au lait cru contre fromages au lait pasteurisé.....	70
2.5.3.4.2	Diversité microbienne et richesse sensorielle.....	71
3.	MATERIELS ET METHODES.....	74
3.1	Le <i>Darfiyeh</i>	74
3.1.1	Technologie artisanale	74
3.1.1.1	Préparation de la peau de chèvre " <i>Dariff</i> ": enceinte d'affinage	74
3.1.1.2	Fabrication des fromages.....	74
3.1.1.3	Conditions d'affinage.....	76
3.1.2	Echantillonnage	77
3.1.2.1	Conditions et fréquences de prélèvement.....	77
3.1.2.2	Conditions de stockage et de transport.....	77
3.2	Caractérisation physico-chimique	77
3.2.1	Laits destinés à la fabrication fromagère	77
3.2.2	Matière grasse du lait.....	78
3.2.2.1	Extraction par la méthode de Röse-Gottlieb.....	78
3.2.2.2	Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse	78
3.2.3	Fromages <i>Darfiyeh</i>	79
3.2.3.1	Mesure du pH.....	79
3.2.3.2	Dosage du taux d'humidité	79
3.2.3.3	Dosage du taux de matière grasse par la méthode de Van Gulick.....	79
3.2.3.4	Dosage du taux des matières azotées.....	80
3.2.3.5	Dosage du taux de chlorures.....	81
3.3	Fractions lipidiques du <i>Darfiyeh</i>.....	81
3.3.1	Lyophilisation des fromages	81
3.3.2	Extraction des lipides.....	81
3.3.2.1	La méthode de Soxhlet.....	82
3.3.2.2	La méthode de Folch <i>et al.</i> (1957).....	82
3.3.3	Analyse des lipides	82
3.3.3.1	Indice d'acide.....	82
3.3.3.2	Chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Iatroscan®)	83
3.3.3.2.1	Principe de l'appareil	83
3.3.3.2.2	Etalonnage des Chromarods-SIII par des molécules standard	83
3.3.3.2.3	Séparation des classes des lipides	84
3.3.3.3	Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse	84

3.4 Analyse des composés volatils par SPME	84
3.4.1 Extraction par SPME	85
3.4.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse - espace de tête.....	85
3.5 Caractérisation microbiologique	86
3.5.1 Numérations bactériennes classiques.....	86
3.5.2 Recherche, isolement et caractérisation des bactéries lactiques issues du <i>Darfiyeh</i>	86
3.5.3 Culture des souches bactériennes de référence	87
3.5.4 Extraction d'ADN génomique.....	88
3.5.4.1 A partir d'un bouillon de culture.....	88
3.5.4.2 A partir de la masse fromagère.....	88
3.5.5 Amplification d'ADN génomique.....	89
3.5.5.1 PCR-TTGE.....	89
3.5.5.2 PCR classique.....	90
3.5.5.3 PCR quantitative en temps réel	91
3.5.5.3.1 Préparation de caillés témoins.....	91
3.5.5.3.2 Conditions d'amplification	92
3.6 Analyse de la peau de chèvre.....	92
3.6.1 Numérations bactériennes classiques.....	92
3.6.2 Dosage du taux d'humidité.....	92
3.6.3 Dosage de l'azote total	93
3.6.4 Détermination de la stabilité hydrothermique de la peau.....	93
3.6.5 Etude de transfert dans un système aliment simulé/peau	93
3.6.5.1 Description du module expérimental et mise en place	94
3.6.5.2 Tests de perméabilité et d'absorption d'acétonitrile dans un système solution aqueuse/peau	95
3.6.5.2.1 Préparation de la solution.....	95
3.6.5.2.2 Tests de perméabilité.....	95
3.6.5.2.3 Tests d'absorption.....	95
3.6.5.3 Tests de perméabilité et d'absorption des molécules aromatiques dans un système solution simulée de <i>Darfiyeh</i> /peau	96
3.6.5.3.1 Préparation et choix des molécules modèles.....	96
3.6.5.3.2 Etalonnage des molécules modèles.....	96
3.6.5.3.3 Montage du système de 20, 40 et 60 jours	97
3.7 Traitement statistique des données.....	97
4. RESULTATS ET DISCUSSION	100
4.1 Caractérisation physico-chimique du fromage <i>Darfiyeh</i>	100
4.1.1 Laits destinés à la fabrication du <i>Darfiyeh</i>	100
4.1.1.1 Composition	100
4.1.1.2 Paramètres physiques	102
4.1.1.3 Analyse des acides gras.....	103
4.1.2 Fromages <i>Darfiyeh</i> au cours de l'affinage.....	104
4.1.2.1 Evolution des paramètres physico-chimiques classiques	105
4.1.2.1.1 pH.....	105
4.1.2.1.2 Taux d'humidité.....	106
4.1.2.1.3 Taux de matière grasse.....	106
4.1.2.1.4 Taux de NaCl	107
4.1.2.1.5 Taux de protéines	107
4.1.2.2 Evolution des fractions azotées	108
4.1.3 Fractions lipidiques du <i>Darfiyeh</i> au cours de l'affinage.....	109
4.1.3.1 Classes de lipides totaux.....	109
4.1.3.2 Indice d'acide et composition en acides gras.....	111
4.1.4 Composés volatils du <i>Darfiyeh</i> au cours de l'affinage.....	116
4.1.4.1 Caractéristiques des molécules volatiles standard.....	116
4.1.4.2 Evolution des composés volatils	118
4.1.4.2.1 Les aldéhydes.....	120

4.1.4.2.2 Les alcools.....	120
4.1.4.2.3 Les cétones.....	121
4.1.5 Conclusion.....	124
4.2 Caractérisation microbiologique du fromage <i>Darfiyeh</i>	124
4.2.1 Introduction.....	124
4.2.2 Evolution des numérations bactériennes classiques au cours de l'affinage du <i>Darfiyeh</i>	125
4.2.3 Identification et caractérisation des isolats de bactéries lactiques issus du <i>Darfiyeh</i>	127
4.2.4 Identification par PCR	129
4.2.4.1 PCR-TTGE.....	129
4.2.4.2 Analyse de <i>S. thermophilus</i>	131
4.2.4.2.1 PCR classique.....	131
4.2.4.2.2 PCR en temps réel.....	132
4.2.4.3 Analyse de <i>E. faecium</i>	136
4.2.4.3.1 PCR classique.....	136
4.2.4.3.2 PCR en temps réel.....	136
4.2.4.4 Analyse de <i>E. durans</i>	138
4.2.4.5 Analyse de <i>Lc. lactis</i>	139
4.2.5 Conclusion.....	141
4.3 Peau de chèvre, enceinte d'affinage du fromage <i>Darfiyeh</i> : caractérisation microbiologique, physicochimique et qualitative	141
4.3.1 Numérations bactériennes classiques.....	141
4.3.2 Dosage des taux d'humidité et d'azote total	142
4.3.3 Evaluation qualitative	143
4.3.4 Détermination de la stabilité hydrothermique de la peau.....	145
4.4 Etude du transfert des composés aromatiques dans un système solution simulée de <i>Darfiyeh</i>/peau.....	146
4.4.1 Transfert de l'acétonitrile dans un système solution aqueuse/peau	146
4.4.1.1 Tests de perméabilité et d'absorption : module à 7 j.....	146
4.4.1.2 Tests de perméabilité et d'absorption : module à 25 j.....	147
4.4.2 Transfert de 2-butanone, 2,3-butanedione et 2-butanol dans un système solution simulée de <i>Darfiyeh</i> /peau	148
4.4.2.1 Propriétés physico-chimiques des molécules modèles	148
4.4.2.2 Tests de perméabilité et d'absorption : module à 20, 40 et 60 jours	151
4.4.2.2.1 Module à 20 jours d'exposition	153
4.4.2.2.2 Module à 40 jours d'exposition	156
4.4.2.2.3 Module à 60 jours d'exposition	159
4.4.2.3 Conclusion.....	162
5. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	164
6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	170
7. ANNEXES.....	191

Liste des figures

Figure 1. Besoins du secteur caprin au Liban.....	26
Figure 2. Coupe transversale d'une peau de chèvre (d'après Holst, 2003).....	32
Figure 3. Structure tridimensionnelle du collagène	35
Figure 4. Carte simplifiée du Liban montrant la zone de production du fromage <i>Darfiyeh</i>	39
Figure 5. Interactions possibles entre aliment-emballage-environnement, les substances concernées et les conséquences correspondantes (adapté de Nielsen et Jägerstad, 1994)	47
Figure 6. Transfert de masse des molécules à travers un matériau d'emballage (adapté de Delassus, 1997) ...	49
Figure 7. Facteurs affectant l'absorption des composés aromatiques par l'emballage (d'après Van Willige <i>et al.</i> , 2000).....	53
Figure 8. Aperçu général des réactions biochimiques pendant l'affinage des fromages	58
Figure 9. Catabolisme des acides gras libres.....	62
Figure 10. Catabolisme des acides aminés pendant l'affinage des fromages	65
Figure 11. Diagramme de fabrication du <i>Darfiyeh</i>	75
Figure 12. Montage expérimental pour la simulation des transferts moléculaires au contact de la peau de chèvre (deux compartiments A et B séparés par une peau de chèvre).....	94
Figure 13. Courbes d'étalonnage de 2-butanol, 2,3-butanedione et 2-butanol.....	97
Figure 14. Classes de lipides totaux de la matière grasse du <i>Darfiyeh</i> extraits par la méthode de Folch <i>et al.</i> (1957) et déterminées par Iatroscan [®] , <i>production A</i> à 60 j d'affinage, LN : lipides neutres, LP : lipides polaires.....	109
Figure 15. Proportions de lipides neutres et polaires (%) de la matière grasse du <i>Darfiyeh</i> extraite par Folch <i>et al.</i> (1957), pour trois lots de production (A, B et C), après 20, 40 et 60 j d'affinage; LN : lipides neutres, LP : lipides polaires.....	110
Figure 16. Pourcentages des acides gras à chaînes courtes (C6:0-C8:0), moyennes (C10:0-C14:0) et longues (C16:0-C18:3) pour trois lots de production de <i>Darfiyeh</i> (A, B et C), après 20, 40 et 60 jours d'affinage; j : jours.....	113
Figure 17. Chromatogramme type du profil des acides gras (%) des lipides totaux du <i>Darfiyeh</i> extraits selon la méthode Soxhlet (AOAC, 1990), <i>production A</i> à 40 jours d'affinage	116
Figure 18. Chromatogramme du mélange des différents standard des composés volatils (à raison de 5 µL de chaque) fournis par Sigma [®]	117
Figure 19. Chromatogramme type des composés volatils du fromage <i>Darfiyeh</i> , <i>production A</i> à 60 jours d'affinage	119
Figure 20. Différentes espèces de bactéries lactiques identifiées dans le fromage <i>Darfiyeh</i>	128
Figure 21. Résultats de la PCR-TTGE des fragments de la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S du <i>Darfiyeh</i> au cours de l'affinage, respectivement à partir de trois lots de productions A, B et C à intervalle de 20 j.....	130
Figure 22. Résultats de la PCR avec le couple d'amorces St1-St2 pour la recherche de <i>S. thermophilus</i> dans le <i>Darfiyeh</i>	132
Figure 23. Profils électrophorétiques des produits de PCR avec le couple d'amorces St1-St2 pour la recherche de <i>S. thermophilus</i> dans le caillé témoin.....	133
Figure 24. (A) Courbe étalon mettant en rapport la quantité d'ADN de <i>S. thermophilus</i> DSM 20617 ^T mesuré par Light Cycler [®] et le nombre d'ufc. mL ⁻¹ ; (B) Quantification des dilutions en série de <i>S. thermophilus</i> DSM 20617 ^T par Light Cycler [®] ; (C) Courbes de fusion, T _m = 90 °C	134
Figure 25. Résultats de la PCR avec le couple d'amorces EM1A-EM1B pour la recherche de <i>E. faecium</i> dans le <i>Darfiyeh</i>	136
Figure 26. (A) Courbe étalon mettant en rapport la quantité d'ADN d' <i>E. faecium</i> DSM 20477 ^T mesuré par Light Cycler [®] et le nombre d'ufc. mL ⁻¹ ; (B) Quantification des dilutions en série d' <i>E. faecium</i> DSM 20477 ^T par Light Cycler [®]	137
Figure 27. Résultats de la PCR avec le couple d'amorces DuHiF-DuR pour la recherche de <i>E. durans</i> dans le <i>Darfiyeh</i>	139
Figure 28. Résultats de la PCR avec le couple d'amorces His 1-His 2 pour la recherche de <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> dans le <i>Darfiyeh</i>	140
Figure 29. Illustration du rétrécissement d'un morceau de peau de chèvre (<i>Dariff A</i> à 20 j d'affinage), dans le cadre de la détermination de la stabilité hydrothermique de la peau	145
Figure 30. Chromatogrammes des tests de perméabilité (a) et d'absorption (b) d'une solution simulée de <i>Darfiyeh</i> (volume total 25 mL, 5 % NaCl, 0,25 mL 2-butanol, 0,25 mL 2,3-butanedione, 0,25 mL 2-butanol), après une durée d'exposition de 20 jours	155

Figure 31. Chromatogrammes des tests de perméabilité (a) et d'absorption (b) d'une solution simulée de <i>Darfiyeh</i> (volume total 25 mL, 5 % NaCl, 0,25 mL 2-butanone, 0,25 mL 2,3-butanedione, 0,25 mL 2-butanol), après une durée d'exposition de 40 jours	157
Figure 32. Chromatogrammes des tests de perméabilité (a) et d'absorption (b) d'une solution simulée de <i>Darfiyeh</i> (volume total 25 mL, 5 % NaCl, 0,25 mL 2-butanone, 0,25 mL 2,3-butanedione, 0,25 mL 2-butanol), après une durée d'exposition de 60 jours	160
Figure 33. Trajectoire d'une molécule modèle dans un système solution simulée de <i>Darfiyeh</i> /peau, après 60 j d'exposition	161

Liste des tableaux

Tableau 1. Répartition régionale (en %) des cheptels des caprins au Liban	24
Tableau 2. Caractéristiques des modes d'élevage au Liban	25
Tableau 3. Forces, faiblesses, opportunités et menaces du secteur caprin au Liban.....	27
Tableau 4. Production annuelle de lait de chèvre au Liban (en milliers de tonnes)	28
Tableau 5. Liste non exhaustive des laits fermentés et des fromages caprins du Liban	29
Tableau 6. Panorama des techniques analytiques qui peuvent être utilisées pour la détermination de l'origine géographique des produits alimentaires	45
Tableau 7. Principaux effets de la glycolyse sur la qualité des fromages	59
Tableau 8. Hydrolyse de la matière grasse du lait pendant l'affinage.....	60
Tableau 9. Hydrolyse des protéines du lait avec apparition de composés aromatiques et modification de la texture	64
Tableau 10. Milieux de culture utilisés et conditions d'incubation	86
Tableau 11. Souches de référence utilisées au cours de cette étude	88
Tableau 12. Caractéristiques des couples d'amorces spécifiques des espèces bactériennes étudiées.....	89
Tableau 13. Conditions d'amplification pour chaque espèce bactérienne recherchée.....	91
Tableau 14. Composition moyenne des laits de chèvre destinés à la production de trois lots de <i>Darfiyeh</i> (A, B et C) ^x , n=3.....	101
Tableau 15. Quelques paramètres physiques des laits de chèvre destinés à la production de trois lots de <i>Darfiyeh</i> (A, B et C) ^x , n=3.....	102
Tableau 16. Composition en acides gras (%) des lipides totaux des laits de chèvre destinés à la production de trois lots de <i>Darfiyeh</i> (A, B et C) ^x extraits selon la méthode de Röse - Gottlieb, n=3.....	104
Tableau 17. Valeurs moyennes ± déviation standard des paramètres physico-chimiques pour trois lots de production de <i>Darfiyeh</i> (A, B et C) ^x jusqu'à 60 jours d'affinage, n=3.....	105
Tableau 18. Valeurs moyennes ± déviation standard des fractions azotées pour trois lots de production de <i>Darfiyeh</i> (A, B et C) ^x jusqu'à 60 jours d'affinage, n=3	108
Tableau 19. Composition en acides gras (%) des lipides totaux du <i>Darfiyeh</i> ^x extraits selon la méthode Soxhlet (AOAC, 1990) jusqu'à 60 jours d'affinage, n=3	112
Tableau 20. Composés volatils identifiés (%) dans le fromage <i>Darfiyeh</i> ^x jusqu'à 60 jours d'affinage, n=3	123
Tableau 21. Numérations bactériennes (Log ufc.g ⁻¹) des différents groupes microbiens pour trois lots de production de <i>Darfiyeh</i> (A, B et C) ^x au cours de l'affinage (DS = 0,1)	126
Tableau 22. Quantification de <i>S. thermophilus</i> par Light Cycler [®] dans les fromages <i>Darfiyeh</i>	135
Tableau 23. Quantification d' <i>E. faecium</i> par Light Cycler [®] dans les fromages <i>Darfiyeh</i>	138
Tableau 24. Numérations bactériennes (ufc.g ⁻¹ peau) pour les trois <i>Dariff</i> des productions de <i>Darfiyeh</i> (A, B et C), (DS [*] = 0,1).....	142
Tableau 25. Valeurs moyennes du taux d'humidité (%) et du taux de l'azote total (%) pour les trois <i>Dariff</i> des productions de <i>Darfiyeh</i> (A, B et C), (DS [*] = 0,1-0,3).....	142
Tableau 26. Paramètres d'intégration de l'acétonitrile dans le système solution aqueuse/peau après une durée d'exposition de 25 j	147
Tableau 27. Propriétés physico-chimiques de 2-butanone, 2,3-butanedione et de 2-butanol	148
Tableau 28. Résultats des tests de perméabilité des molécules aromatiques dans un système solution simulée de <i>Darfiyeh</i> /peau, après 20, 40 et 60 j d'exposition	152
Tableau 29. Résultats des tests d'absorption des molécules aromatiques dans un système solution simulée de <i>Darfiyeh</i> /peau, après 20, 40 et 60 j d'exposition	152
Tableau 30. Epaisseur des morceaux de peau de chèvre destinés à séparer entre les deux compartiments A et B	153

Liste des annexes

Annexe 1. Illustration des différentes étapes de la préparation de la peau de chèvre.....	191
Annexe 2. Illustration des différentes étapes de fabrication du fromage Darfiyeh	193
Annexe 3. Illustration de la préparation du fromage de lactosérum ou "Arichi"	195
Annexe 4. Illustration des conditions d'affinage du Darfiyeh	196
Annexe 5. Standard fournis par SIGMA-Aldrich (France) et utilisés pour l'identification des composés volatils du Darfiyeh	197
Annexe 6. Chromatogrammes des tests de perméabilité et d'absorption d'une solution de 99 mL H ₂ O distillée + 1 mL acétonitrile, après une durée d'exposition de 25 jours	198

Nomenclature

Unités et symboles :

AOC	appellation d'origine contrôlée
AOP	appellation d'origine protégée
BIS	bureau indien des standards
Ct	cycle threshold (seuil de cycle)
g	gramme
h	heure
IGP	indication géographique protégée
j	jour
J.-C	Jésus-Christ
L	litre
L.L.	livre libanaise
LSD	least square difference
m²	mètre carré
mg	milligramme
min	minute
mm	millimètre
mM	Millimolaire
µg	microgramme
n	nombre de répétitions
nd	non déterminé
s	seconde
pb	paire de base
pmol	picomolaire
R²	coefficient de corrélation
STG	spécialité traditionnelle garantie
ua	unité arbitraire
ufc	unité formant colonie
€	euro

Techniques / méthodes :

CCM-DIF	chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme
PCR	polymerase chain reaction
SPME	micro-extraction sur phase solide

Molécules / chimie :

ADN	acide désoxyribonucléique
ANC	azote non caséique
ANP	azote non protéique
CAR	carboxène

DVB	divinylbenzène
IA	indice d'acide
EVOH	éthylène vinyle alcool
LDPE	polyéthylène basse densité
LPC	lysophosphatidylcholine
LPL	lipoprotéine lipase
MGLA	matière grasse laitière anhydre
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
NSLAB	non specific lactic acid bacteria
NT	azote total
PC	phosphatidylcholine
PDMS	polydiméthylsiloxane
PE	phosphatidylethanolamine
PEBA	polyéther-block-polyamide
PGE	estérase pré-gastrique
PI	phosphatidylinositol
PL	phospholipide
PS	phosphatidylsérine
SPM	sphingomyéline

Milieux de culture :

MRS	de Man, Rogosa, Sharpe agar
MSA	mannitol salt agar
PCA	plate count agar

Laboratoires / Universités / Organisations :

CAN	Centre Agricole du Nord
CNRS	Centre National de Recherche Scientifique
ENSAIA	Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
FRM	Fondation René MOAWAD
FSA	Faculté des Sciences Agronomiques
INAO	Institut National des Appellations d'Origine
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
LIBNOR	Institut des Normes Libanaises
LSGA	Laboratoire de Sciences et Génie Alimentaires
SFFD	Slow Food Foundation for Biodiversity
USEK	Université Saint-Esprit de Kaslik

1. Introduction générale

1. Introduction générale

Parmi l'extraordinaire floraison des fromages, le fromage de chèvre fermier occupe assurément une très belle place. Chez les connaisseurs, il jouit d'une réputation bien ancrée et amplement justifiée. Il est vrai que l'absence d'un "chèvre" typique, affiné ou frais, sur un plateau de fromages est souvent synonyme de frustration !

Parmi tous les autres, les fromages de chèvre méditerranéens fabriqués à partir de lait cru, bénéficient d'une image à très forte connotation positive. Ils sont identifiables en raison de paramètres objectifs (saveur, composition, forme), mais surtout en raison de caractéristiques culturelles ou subjectives, comme l'histoire, le terroir et le soleil, qu'ils peuvent évoquer chez le consommateur. Toutefois, il manque parfois à ces produits la dénomination prestigieuse, seule capable de retracer l'histoire et la typicité, entourées d'un savoir-faire ancestral. Cette "appellation d'origine", puisque c'est d'elle dont il s'agit, prend alors une dimension patrimoniale et confère au fromage un prestige authentique. Celui-ci devient alors un bien commun que la société va s'efforcer de protéger. Un fromage ainsi qualifié apparaîtra comme le reflet fidèle de la région dont il est originaire, avec ses ressources naturelles et ses traditions locales.

Les modes de fabrication fermiers sont aussi nombreux que variés et on ne peut guère les qualifier de *process*. Chaque producteur possède son tour de main et son savoir-faire, qu'il tire des conditions locales de fabrication et de traditions séculaires. Ce sont des fromages fortement typés, mais dont on a du mal à maîtriser toutes les conditions de production. Leur inventaire met en évidence leur extrême hétérogénéité catégorielle, des niveaux de production très divers, des conditions d'affinage et des qualités organoleptiques particulièrement variées. Cette grande variabilité, qui signifie une certaine inconstance des caractéristiques, permet au fromage d'acquérir différentes "versions", à l'intérieur d'une même zone géographique.

Un fromage fermier typique au lait cru implique naturellement une grande diversité génétique de sa flore microbienne qui comprend la flore utile ou technologique, la flore indésirable et la flore potentiellement pathogène. Cette microflore, qualifiée de naturelle ou indigène permet de préserver la typicité et une certaine diversité sensorielle des fromages.

Selon ces considérations, le fromage typique représente un bien culturel avant d'être une ressource économique. De nombreux produits originaux ont déjà disparu ou sont en voie de l'être et l'on entend parler parfois de véritable *génocide culturel* !

Au delà des emprunts aux autres régions de la méditerranée, le Liban a été le cœur d'échanges intenses qui ont favorisé l'adoption de caractéristiques communes dans la diversité des ses produits. Ces derniers reflètent l'histoire des populations et ne respectent pas les frontières géographiques. Le fromage *Darfiyeh*, par exemple, est influencé par la culture ottomane.

Il faut noter que la production fermière libanaise des fromages de chèvre n'a pas su maintenir au meilleur niveau la qualité traditionnelle qui lui aurait permis de conserver sa place sur le marché, face à la production industrielle des grandes variétés de fromages au lait de vache à diffusion nationale. L'élevage caprin est détenu par des petits éleveurs, habitant des zones marginales et pour lesquels le lait de chèvre est une ressource vitale importante.

Une contribution scientifique et technique décisive pourrait grandement favoriser la valorisation de ce type de ressources et pourrait stimuler le secteur caprin libanais. Traditionnellement fabriqué dans les montagnes Libanaises, le *Darfiyeh* est un outil intéressant de ce point de vue. Il présente une technique de fabrication artisanale exceptionnelle nécessitant l'usage d'une peau de chèvre comme enceinte d'affinage et le lait issu d'un troupeau local ou *Baladi*.

Etant donné que la production laitière caprine est saisonnière, les fromages n'apparaissent que périodiquement sur le marché. Quant au *Darfiyeh*, sa longue durée de conservation permet une disponibilité de vente hors saison, d'où l'importance de mieux valoriser les laits de chèvre par leur transformation en *Darfiyeh*. Ce dernier est le seul produit agricole au Liban et au Moyen-Orient à bénéficier de la note "*Presidia*", délivrée par la *Fondation Slow Food pour la biodiversité* (SFFD), comme les fromages *Gloucester* (Angleterre), *Serpa* (Portugal) et *Niotiko* (Grèce), ...

Cependant, le *Darfiyeh* demeure un fromage clandestin. En effet, jusqu'à aujourd'hui le Liban ne possède aucune législation sur les fromages au lait cru, qui n'ont donc aucune existence légale et l'on peut comprendre l'hésitation légitime du consommateur. C'est l'appellation d'origine, à fort potentiel d'amélioration de la qualité et de maintien de la biodiversité, qui pourra apporter une contribution scientifique et technique décisive au secteur libanais de la transformation et de la

valorisation durable de ce type de ressources, encore marqué par un faible contenu technologique. La commercialisation du *Darfiyeh* ne pouvait donc pas être autorisée officiellement, ni contrôlée du fait de ce "vide juridique", qui est actuellement en passe d'être comblé.

La grande tradition de la qualité fermière tend malheureusement à disparaître peu à peu. Le monde rural connaît une mutation profonde. Nous ignorons le devenir de ces produits, mais il convient de faire ce qui est possible pour maintenir leur vitalité.

Un intérêt accru s'est manifesté ces dernières années pour la sauvegarde des produits traditionnels en utilisant les indications géographiques. Les aliments bénéficiant d'une origine géographique bien déterminée ont particulièrement attiré le consommateur, d'abord pour les qualités organoleptiques et culinaires spécifiques associées aux produits régionaux, mais aussi pour la santé, le patriotisme (!) et l'attention manifestée par les médias.

De ce point de vue, le développement de techniques analytiques fines pour la détermination de l'origine géographique de produits agricoles est indispensable. En complément des techniques de séparation de type chromatographique, les techniques moléculaires ont le vent en poupe.

Dans l'optique de sauvegarder le patrimoine du *Darfiyeh* et de préserver cette tradition culinaire ancestrale en voie de disparition par une appellation, la Fondation René MOAWAD, une organisation libanaise non gouvernementale, en partenariat avec la SFFD, a soutenu le projet "*Darfiyeh*". Le but de cette opération est de permettre aux éleveurs de la région montagnarde Nord Libanaise, de tirer profit de la production d'un fromage à haute valeur ajoutée, par la transformation de leur lait.

De plus, le Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) au Liban, a mis en place depuis 2005, un projet pour maintenir la biodiversité de la flore lactique des fromages caprins traditionnels. Le but est la constitution de collections de souches que devrait envisager la conservation de la diversité biologique, tant pour son utilité présente que pour l'usage qu'elle pourrait en faire un jour. Il convient de déterminer combien ces institutions sont prêtes à payer pour conserver les espèces et les écosystèmes. Toutefois la valeur économique néglige la valeur esthétique de la diversité biologique ainsi que le rôle crucial qu'elle joue dans la sécurité alimentaire et la médecine.

Avec ces connaissances et compte tenu de ces observations, le sujet de cette thèse s'intègre dans les projets exposés brièvement ci-dessus. Il ne s'inscrit pas dans une continuité de travaux effectués précédemment. L'objectif scientifique de ce travail est de valoriser le fromage

Darfiyeh, en le caractérisant du point de vue physico-chimique et microbiologique durant son affinage, et de mieux comprendre son affinage dans la peau de chèvre en simulant celui-ci dans son enceinte d'affinage.

Dans ce contexte, une synthèse bibliographique précède l'exposé des travaux. Elle comporte cinq parties. Une première partie permet de situer la filière caprine au Liban, notamment le secteur de l'élevage et le secteur laitier. Les forces, les faiblesses, les opportunités et les menaces de cette filière seront exposées. Des observations sur l'élevage de la chèvre, l'historique de sa domestication, une étude de la peau de chèvre, de sa structure et son utilisation feront l'objet de la deuxième partie. La troisième partie sera consacrée spécifiquement au fromage *Darfiyeh* et aux indications géographiques. Dans le but d'appréhender la réalité concrète du *Darfiyeh* artisanal, son historique, sa consommation et sa commercialisation seront incluses dans cette partie. La réglementation et les démarches législatives d'une Appellation d'Origine seront exposées brièvement. Le *Darfiyeh* s'affinant dans la peau de chèvre (celle-ci étant considérée comme un emballage naturel), les interactions aliment-emballage-environnement, notamment la perméabilité et l'absorption, seront exposées dans la quatrième partie. La dernière section résume quelques notions indispensables sur l'affinage des fromages, comme la lipolyse et la protéolyse. Cette partie se termine par un exposé sur la flore bactérienne de l'affinage, notamment la flore lactique, dans sa biodiversité et sa complexité.

L'orientation de notre travail, concrétisée par notre approche expérimentale qui a touché à plusieurs axes, comporte trois volets principaux :

- la première partie repose, d'une part sur la caractérisation physico-chimique des laits de chèvre destinés à la production du *Darfiyeh* ; d'autre part, sur le suivi de l'évolution de la lipolyse et de la protéolyse au cours de l'affinage du *Darfiyeh*. La recherche de composés d'arôme a permis d'établir le profil des composés volatils, ce qui pourrait refléter le caractère typique et marqué du *Darfiyeh*.

- la seconde partie consiste à établir la signature microbienne du *Darfiyeh*, et ceci par deux approches. La première consiste en une culture des micro-organismes sur des milieux sélectifs, suivie d'une identification au niveau du genre et/ou de l'espèce. Une deuxième approche, consiste à identifier l'écosystème naturel du *Darfiyeh* au moyen de techniques de la biologie moléculaire. Une image globale des communautés bactériennes du *Darfiyeh* a été réalisée par la technique

TTGE. Les suivis de *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *E. durans* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ont été réalisés par la méthode PCR classique et la quantification de *S. thermophilus* et d' *E. faecium* par PCR en temps réel.

- Afin de mieux comprendre les phénomènes de transfert de composés aromatiques à travers la peau de chèvre, nous avons opté pour une simulation du *Darfiyeh* dans son enceinte naturelle d'affinage, grâce à un montage expérimental original. Nous avons tenté de suivre le transfert éventuel de trois molécules aromatiques modèles (la 2-butanone, la 2,3-butanedione et le 2-butanol) dans un système solution simulée de *Darfiyeh*/peau après 20, 40 et 60 jours d'exposition.

Les principes des techniques expérimentales utilisées seront détaillés dans la partie "Matériels et méthodes". Les résultats, couplés à une discussion intégrée illustrent les tests effectués. Une conclusion générale permet d'ouvrir sur les perspectives de ce travail. Comme nous l'avons dit plus haut, il faut rappeler que ce travail de recherche ne s'inscrit pas dans une continuité de travaux effectués précédemment. Les trois axes principaux de notre travail pourront être exploités plus profondément dans des futurs travaux, en poursuivant éventuellement la piste de recherche que nous avons menée et dont ils pourront s'inspirer.

Cette étude donnera lieu aux publications suivantes et a déjà donné lieu aux communications citées ci-dessous :

Publications

Serhan, M., Cailliez-Grimal, C., Borges, F., Hosri, Ch., Fanni, J., 2008. Diversity of *Darfiyeh* natural ecosystem during ripening (*Article soumis à FEMS Microbiology Ecology*).

Serhan, M., Linder, M., Hosri, Ch., Fanni, J. 2008., Physico-chemical modifications and evolution of lipolysis and proteolysis during ripening of traditional Lebanese *Darfiyeh* cheese. (*Article soumis à Journal of Dairy Research*)

Communication avec actes

Serhan, M., Hosri, Ch., Cailliez - Grimal, C., Fanni, J., 2007. Characteristics of Lebanese *Darfiyeh* cheese made from raw goat's milk. *In*: Proceedings of the, CRA/IGA, International Symposium, the quality of goat products: models and tools for evaluation and promotion, p. 66-69, editeur : Roberto Rubino et Lucia Sepe, publie par *International Goat Association*, CRA - ZOE, Potenza, Italie (ISBN 978-88-902901-1-4, 270 p).

Communication par affiche

Serhan, M., Linder, M., Hosri, Ch., Fanni, J., 2007. Evolution of lipolysis during the ripening of traditional Lebanese *Darfiyeh* cheese. 5th Euro Fed Lipid Congress - Oils, Fats and Lipids: From Science to Applications. Gothenburg- Sweden, 16-19 September 2007.

Communication orale

Serhan, M., Linder, M., Hosri, Ch., Fanni, J., 2007. Technologie fromagère - Laits de chèvre - Cas du fromage *Darfiyeh* au Liban, Traditional cheese making and ageing techniques, *CORFILAC*, *Consorzio Ricerca Filiera Lattiero Casearia* within iPWO Project, international Professional Women Opportunity, 29 Avril-11 Mai 2007, Ragusa, Sicile, Italie.

2. Revue bibliographique

2. Revue bibliographique

2.1 Filière caprine au Liban

2.1.1 Secteur de l'élevage caprin au Liban

2.1.1.1 Contexte

D'après le Recensement Général de l'Agriculture de 1999, établi par la FAO (1999), 7 500 exploitations agricoles pratiquaient une activité d'élevage de caprins. La taille moyenne des troupeaux est de 70 têtes. Après un pic d'accroissement en 1999, le nombre de têtes de caprins a diminué de 17 % entre 1997 et 2001 avec un cheptel comptant environ 400 000 têtes (**Tableau 1**). L'élevage caprin a perdu 100 000 têtes en 4 ans, ce qui n'est pas rassurant pour l'avenir de ce secteur.

Ces diminutions sont liées à plusieurs facteurs dont :

- les problèmes sanitaires ;
- la valorisation insuffisante des produits ;
- des ressources alimentaires limitées.

Tableau 1. Répartition régionale (en %) des cheptels des caprins au Liban

Années	Nombre de têtes	Mont Liban	Nord	Békaa	Sud	Nabbatieh
2001	399 000	9*	18	42	7	24
2000	417 000	9	15	47	8	21
1999	436 000	10	13	51	9	17
1998	466 000	13	15	47	10	15
1997	497 000	15	18	43	11	13

Source : Recensement Général Agricole, données et enquêtes annuelles de la FAO et du Ministère de l'Agriculture Libanaise (1999), dans le compte-rendu d'étude (2003) : Les filières lait et viande des ruminants au Liban,

*% du nombre de têtes

Trois principaux systèmes d'élevage de caprins dominant : sédentaires, transhumants ou semi-nomades. La principale race est la *Baladi* (il s'agit d'une sous-population libanaise très proche apparentée aux races des autres pays de l'Est de la Méditerranée), elle est suivie de la race *Chami* ou *Damasquine*, peu répandue et originaire de Syrie comme son nom l'indique.

L'élevage caprin est détenu par des petits éleveurs, habitant des zones marginales et pour lesquels le lait de chèvre constitue une ressource de vie importante. Les principales régions d'élevage au Liban sont la Békaa et le Nord ; le troupeau caprin estimé à 400 000 têtes, est élevé dans les régions de montagne selon un système d'élevage extensif, utilisant la race *Baladi*, la plus adaptée aux conditions environnementales existantes (Abi Saab *et al.*, 1997).

2.1.1.2 Caractéristiques des systèmes d'élevage en vigueur au Liban

Les caractéristiques des modes d'élevage des caprins au Liban sont décrites dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Caractéristiques des modes d'élevage au Liban

	Elevages sédentaires	Elevages semi-nomades et transhumants
Taille du troupeau	200 à 300 têtes	300 à 500 têtes
Rendement laitier/an	Environ 60 kg par chèvre	120 à 130 kg par chèvre
Ecoulement	Autoconsommation, surplus écoulé localement après légère transformation en laits fermentés, ventes aux laiteries	Fromages de garde
Alimentation	Concentrés + fourrage	Parcours/pâturages
Revenus	Viande 55 %, lait 38 %, fumier 7 %	Viande 55 %, lait 41 %, fumier 4 %

Source : Rapport de la mission (CIRVAL-FAO) effectuée du 13 au 20 octobre 2003

2.1.1.3 Evaluation des besoins

Les besoins se situent à quatre niveaux :

- un environnement institutionnel peu favorable ;
- une transformation laitière peu élaborée;
- la production, la situation sanitaire précaires ;
- la gestion des parcours.

La **Figure 1** synthétise les besoins du secteur caprin libanais.

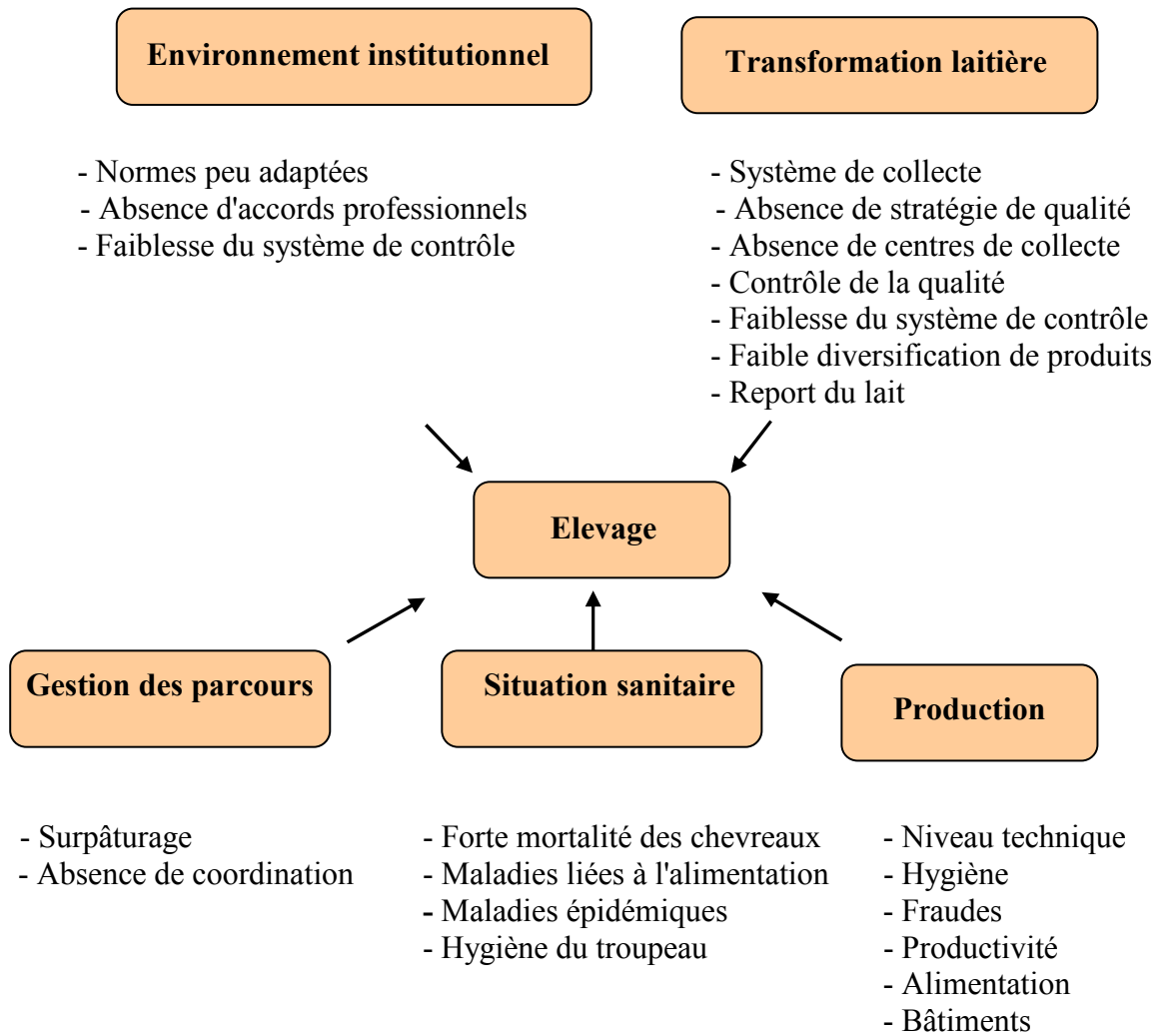


Figure 1. Besoins du secteur caprin au Liban

Source : Compte-rendu d'étude (2003) : Les filières lait et viande des ruminants au Liban

2.1.1.4 Forces, faiblesses, opportunités et menaces du secteur caprin

D'après le compte-rendu de l'étude faite sur les filières lait et viande des ruminants au Liban par le Ministère des Affaires Etrangères Français et l'Institut de l'Elevage, les forces, faiblesses, opportunités et menaces de cette filière ont été synthétisées dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Forces, faiblesses, opportunités et menaces du secteur caprin au Liban

Forces	Faiblesses
- Forte valorisation du produit brut (le prix du lait de chèvre avoisine les 750 LL contre 400 LL pour le lait de vache) (1 LL = 0,0005 €)	-Saisonnalité de la production instable accroissant les risques liés à la commercialisation
-Meilleure valorisation des fromages à partir du lait de chèvre	-Absence d'une politique publique de développement intégré de l'élevage
-Forte demande de produits transformés	-Absence de respect des normes de qualité
-Attachement des consommateurs au caractère traditionnel des fromages libanais	-Insuffisance des programmes de vulgarisation et d'organisation
-Prolificité élevée des chèvres	-Problèmes alimentaires nuisant à la production
-Viande de chèvre consommée au Liban	-Absence de formation des éleveurs
Opportunités	Menaces
-Utilisation rationnelle des terrains non cultivés disponibles pour les parcours	-Détérioration de l'image du produit du fait des insuffisances en matière d'hygiène
-Existence de débouchés traditionnels pour les produits issus de l'élevage caprin	-Forte diminution du cheptel
-Possibilité d'amélioration de la production <i>via</i> l'adoption de races génétiquement sélectionnées	
-Absence de production industrielle	
-Concurrence étrangère limitée (prix prohibitifs pour une grande partie de la population)	

Source : Compte-rendu d'étude (2003) : Les filières lait et viande des ruminants au Liban

La durabilité du secteur caprin s'avère essentielle au Liban malgré le paradoxe lié à cette filière :

- c'est un élevage étroitement lié au terroir, voire à la durabilité de certains écosystèmes en zone aride ;
- c'est une production de lait à la typicité appréciée et unanimement recherchée par tous les Libanais, qui sont prêts à payer cher ;
- c'est un élevage autonome et économe, peu gourmand en intrants importés ;
- c'est une activité qui permet de faire vivre près de 10 000 familles dans des zones difficiles ;

- c'est une activité économique qui semble avoir trop longtemps été négligée par les Pouvoirs Publics à tous les niveaux, sans doute à cause de son image trop traditionnelle et à sa faible implication dans les réseaux commerciaux modernes.

2.1.2 Secteur caprin laitier au Liban

2.1.2.1 Production et rendement laitier

La production des laits de chèvre est en diminution notoire depuis 1997, suivie d'une progression faible depuis 2000 (**Tableau 4**).

Tableau 4. Production annuelle de lait de chèvre au Liban (en milliers de tonnes)

Années	Lait de chèvre	Total des laits
2001	27,3	216,7
2000	26,9	208,1
1999	26,5	199,6
1998	29,0	193,8
1997	31,9	194,0

Source : Recensement Général Agricole, données et enquêtes annuelles de la FAO et du Ministère de l'Agriculture Libanaise (1999), dans le compte-rendu d'étude (2003) : Les filières lait et viande des ruminants au Liban

Le rendement laitier des chèvres (kg/an) varie entre 124 et 144. Une timide tendance à la hausse est perceptible et ceci est dû à l'évolution des systèmes d'élevage qui favorise des périodes de lactation plus longues.

2.1.2.2 Saisonnalité de la production laitière

La production laitière des chèvres est beaucoup plus saisonnalisée que celle des vaches. Les périodes de reproduction sont donc encore presque toujours calées sur la pousse de l'herbe ou bien sur la disponibilité en sous-produits de récolte, ce qui donne une production de lait de chèvre d'avril à septembre – octobre, avec une quasi-absence en hiver et au printemps.

2.1.2.3 Diversité des laits fermentés et des fromages caprins

Les produits laitiers caprins présentent une diversité modérée (**Tableau 5**). Les fabrications les plus connues sont limitées au *Laban* et *Labneh* alors que l'essentiel des fabrications les plus typiques concernent le *Darfiyeh* et l'*Anbaris*.

Le *Laban* et le *Labneh* sont des produits à consommer frais, avec une durée d'utilisation optimale de trois semaines. Cependant, ils sont très appréciés par le consommateur libanais (Hajj, 1999). Quant au fromage *Darfiyeh*, dont la méthode de fabrication est beaucoup plus compliquée, il procure aux éleveurs un revenu assez satisfaisant tout au long de l'année, en raison de sa longue durée de conservation.

Tableau 5. Liste non exhaustive des laits fermentés et des fromages caprins du Liban

Nom	Aspect	Technologie	Zones de production	Type de fabrication
<i>Laban</i>	Yaourt en pots, non sucré ni aromatisé	Lait pasteurisé, ferments thermophiles	Proche et Moyen-Orient	Familiale, fermière ou artisanale
<i>Labneh</i>	Fromage frais En sacs (500 g)	Laban égoutté en sac 24 à 48 h	Egypte, Irak, Liban	Familiale, fermière ou artisanale
<i>Mouchalili</i> ou <i>Jdel</i>	Effilé, en forme de tresse	Fromage frais pasteurisé	Liban	Fermière, fréquente
<i>Baladi</i> ou <i>fromage vert</i>	Boules de 10 cm de diamètre	Fromage cru avec présure, pressé à la main	Liban	Fermière, fréquente
<i>Anbaris</i>	Masse en pots	Fromage cru fermenté en jarres	Région de Békaa et Chouf au Liban	Fermière, rare
<i>Darfiyeh</i>	Boules conservées dans une peau de chèvre	Lait cru mûré, emprésuré et caillé, moulé à la main	Montagnes Nord Libanaises	Fermière, très rare
<i>Arichi</i>	Fromage frais	Sérum de fabrication issu du <i>Darfiyeh</i> chauffé à 90 °C	Montagnes Nord Libanaises	Fermière, très rare

Source : Compte-rendu d'étude (2003) : Les filières lait et viande des ruminants au Liban

2.1.2.4 Perspectives de protection des produits laitiers

La consommation interne des produits laitiers est en augmentation croissante. Le marché libanais est encore largement dirigé par les importations, surtout des fromages et des beurres. La restructuration de la filière laitière libanaise et surtout caprine doit être pilotée par la proposition

de distinction des produits laitiers caprins entre produits "innovants", produits de consommation courante ou produits libanais "définis" et produits d' "Appellation d'Origine Contrôlée (AOC)".

Les produits "innovants" répondent aux attentes implicites des consommateurs (hygiène, étiquetage). Seules sont prises en compte, pour le contrôle, les règles définies au niveau de l'Etat.

Les produits "définis" sont des produits « traditionnels ». Leur définition (caractéristiques du produit et règles de production) est transcrite dans une norme du LIBNOR (Institut des Normes Libanaises). Leur contrôle est de type « certification de conformité ».

Les produits AOC sont en lien avec le développement local, les règles sont proposées par les producteurs et validées par l'ensemble des acteurs locaux. Cette AOC, non encore effective, sera basée sur une structuration nationale respectant les deux aspects "garantie de la qualité" et "maintien de la biodiversité".

L'avenir des produits laitiers méditerranéens et en particulier celui du secteur caprin dépendra de la capacité à orienter la politique actuelle vers la protection de ces produits traditionnels et leur commercialisation au niveau du marché Européen et Nord Américain qui sont saturés par la consommation des produits de masse standardisés, mais qui resteront toujours ouverts sur la biodiversité et la qualité des produits typés (Boyazoglu et Morand-Fehr, 2001 ; Dubeuf *et al.*, 2004).

Dans le but de préserver les produits laitiers libanais fermiers liés à une région bien déterminée et tout particulièrement le fromage *Darfiyeh*, des observations sur la chèvre et le *Darfiyeh* feront l'objet des sections suivantes.

2.2 Observations sur l'élevage de la chèvre

2.2.1 Historique de la domestication de la chèvre

Il est généralement admis que les chèvres (*Capra hircus*) ont une répartition géographique plus large qu'aucun autre animal domestique ; elles ont été les premières parmi les animaux de ferme à s'être développées en étroite association avec l'homme. La chèvre actuelle tire son origine de la

chèvre sauvage (*Capra aegagrus*) que l'on trouve encore dans des régions difficilement accessibles de l'Asie mineure et de l'Asie intérieure.

En étudiant l'ADN mitochondrial de plusieurs centaines de chèvres provenant de 44 pays de l'Ancien Monde, Luikart *et al.* (2001) ont montré que les chèvres domestiques auraient pu jouer un rôle particulier, différent de celui des autres animaux domestiques, durant la diffusion de l'agriculture au cours du Néolithique. Les résultats marquants prouvent que les chèvres domestiques actuelles descendent d'au moins trois lignées femelles ancestrales. La lignée la mieux représentée correspond probablement à la domestication initiale dans le croissant fertile (Proche et Moyen-Orient), vers 8 000 av. J.-C.

Il y a 6 000 ans environ, des modifications climatiques importantes ont provoqué l'inondation de larges superficies dans le bassin du Tigre et de l'Euphrate. Ces événements catastrophiques sont probablement à l'origine des récits rapportés dans la Bible. Des animaux de toutes espèces, y compris la chèvre, auraient été rassemblés dans des constructions flottantes pour en assurer la survie. Dans les premiers livres de la Bible, figurent de nombreuses mentions de chèvres appartenant à des groupes nomades qui auraient fusionné avec les tribus d'Israël. Toutefois, les dates des premiers rassemblements de populations nomades demeurent inconnues à ce jour (French, 1971).

Au Levant et plus précisément au Liban, Wasse (2001) a évoqué les preuves d'une domestication ancienne des chèvres sauvages au Liban. Il a mentionné que les chèvres sauvages Perses ont été domestiquées dans les zones montagnardes jouxtant les montagnes Libanaises, à l'époque où les communautés agricoles ont migré vers les zones de steppes du centre et de l'ouest du Levant.

2.2.2 La peau de chèvre

2.2.2.1 Structure de la peau

Dans la peau de chèvre brute, au moins quatre structures distinctes peuvent être différenciées (**Figure 2**).

- la couche extérieure (ou) épiderme qui est en contact avec l'extérieur et qui subit les agressions ;

- la surface dermique (ou) couche de grain ; qui est la couche de cellules vivantes, organisées en un tissu très serré. C'est le lieu de naissance des poils et où sont présentes les terminaisons nerveuses ;
- la jonction entre la surface dermique et l'endoderme ;
- l'endoderme (ou) corium (la majeure partie du derme).

La couche de chair ou hypoderme est une couche majoritairement constituée de cellules graisseuses ; c'est un tissu lâche qui présente une structure adjacente aux tissus du corps.

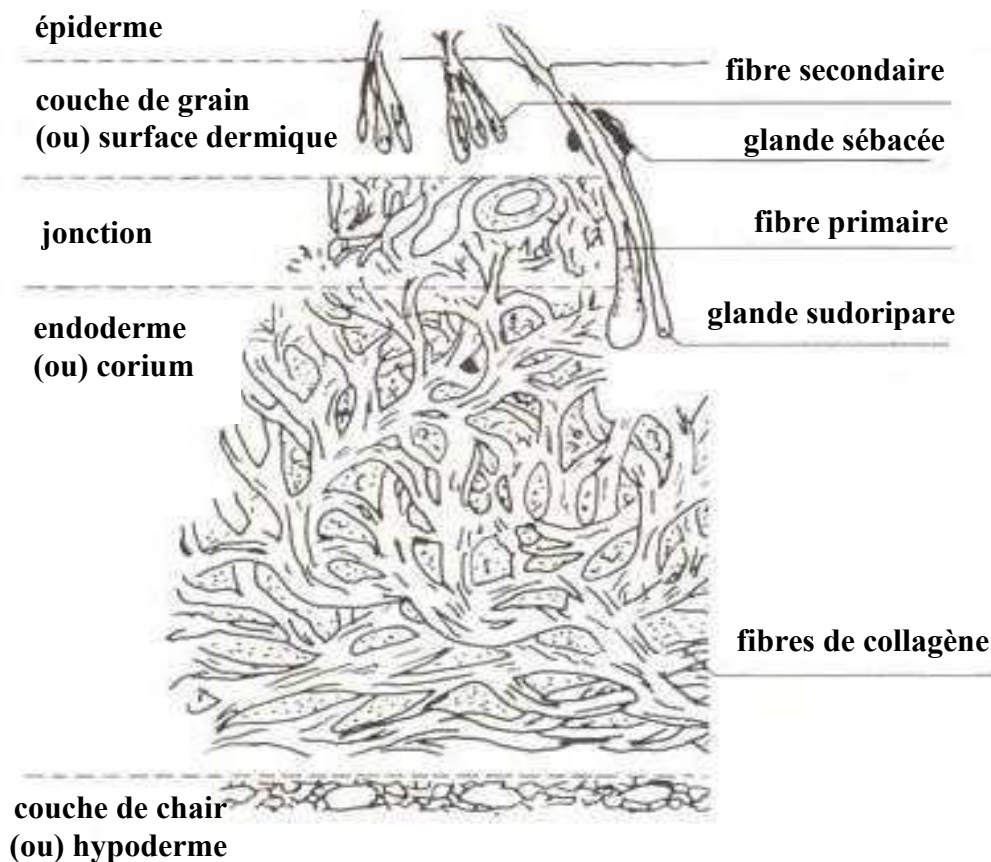


Figure 2. Coupe transversale d'une peau de chèvre (d'après Holst, 2003)

Le tissu dermique ou endoderme désigne la quantité de derme servant à faire le cuir et sa composition véritable. Ce terme englobe des facteurs comme la densité de chaque faisceau de fibres ainsi que l'angle de tissage de ces faisceaux et leur entrelacement. Certains cuirs peuvent être bien en chair, élastiques et résistants en raison de la structure de l'entrelacement, de la résistance et de la taille des faisceaux de fibres et de l'absence de grands espaces interfibrillaires. D'autres possèdent un tissu plus ouvert, des angles différents d'entrelacement des fibres et une plus grande pénétration du derme par les follicules pileux, les glandes sébacées, etc., qui rendent

plus lâche la texture et le toucher du cuir. De toute évidence, ces facteurs jouent un rôle important pour la détermination des caractéristiques physiques du produit. Des faisceaux de fibres mobiles et fortes sont exigés pour des peaux très élastiques et la présence de grands espaces interfibrillaires est souhaitée pour des peaux sans élasticité et sans résistance.

Les poils sont simplement la prolongation, à la surface de la peau, des structures qui sortent des follicules pileux qui pénètrent la surface du grain et se ramifient dans le derme. La plupart des chèvres élaborent des fibres à partir de deux types de follicules. Les follicules larges (primaires) produisent des fibres médulleuses, épaisses, alors que les follicules secondaires plus nombreux produisent des fibres fines non médulleuses. Ce sont la taille et le modèle des trous des fibres qui conditionnent la surface du grain ; plus la fibre est épaisse, plus les trous sont grands (Holst, 2003). Dans différentes races et dans différents sujets, la profondeur de pénétration varie beaucoup ; des fibres dures qui pénètrent profondément produisent évidemment un type plus ouvert et plus spongieux de cuir que des poils fins peu enfoncés. Par conséquent, les meilleures peaux imperméables sont celles des chèvres ayant une toison courte, fine et soyeuse. Les fibres primaires et secondaires suivent le cycle de croissance (French, 1971).

Sous l'épiderme, une couche plus dense est présente et qui devient le grain ou la surface externe du cuir. Les follicules pileux pénètrent cette surface et confèrent la structure caractéristique du grain.

La peau de chèvre est une substance solide et se laisse moins pénétrer par les follicules de poils torsadés que la peau de mouton ; elle donne, par conséquent, des cuirs plus fermes d'un type différent et convenant à des usages divers.

2.2.2.2 Composition de la peau

La composition générale d'une peau de chèvre brute est la suivante :

H ₂ O	64 %
Protéines	33 %
Matière grasse	2 %
Sels minéraux	0,5 %
Autres substances (pigments, ...)	0,5 %

Les protéines se répartissent de la manière suivante :

- Protéines de structure ou élastine (fibre de couleur jaune tissée dans la fibre du collagène)	0,3 %
- Collagène	29 %
- Kératine (protéine des poils et de l'épiderme)	2 %
- Protéines non structurales, ou albumines ou globulines (protéines solubles non fibreuses)	1 %
- Substances muqueuses associées aux fibres	0,7 %

La peau de chèvre contient, après avoir été retirée de la carcasse, un pourcentage élevé d'eau dans les tissus (60-70 %) et une quantité appréciable à la surface, et des protéines (25-33 %). Comme la matière sèche de la structure cellulaire contient une grande quantité de protéines, les peaux fournissent naturellement un milieu idéal pour la prolifération des bactéries et des micro-organismes (Kanagaraj *et al.*, 2005a). Ceux-ci se nourrissent dans les tissus de la peau et se multiplient de façon si importante et si rapide que la peau fraîche devient inévitablement contaminée, notamment dans un climat chaud.

Le collagène insoluble est le constituant majeur de la peau de chèvre ; il constitue environ 95 % de la peau dégraissée et dépourvue de poils. Ce pourcentage dépend de l'âge et du sexe de l'animal (Hansen *et al.*, 1992).

Le collagène est une protéine fibreuse, sécrétée par les fibroblastes et assemblée à l'extérieur des cellules, dans la matrice extra-cellulaire. Il est présent dans tous les tissus. Ceux qui contiennent du collagène sont plus résistants et ont davantage d'élasticité comparativement aux tissus qui n'en possèdent pas. Le collagène est composé principalement de trois acides aminés : la glycine pour 35 %, la proline pour 7 à 9 % et l'hydroxyproline pour 12 à 14 % (selon les types de collagènes) (Darnell *et al.*, 1990). Jusqu'à aujourd'hui, le collagène est classé en 23 types différents. Celui de type I, objet de notre étude, se retrouve dans la plupart des tissus conjonctifs ; il est abondant dans le derme, les os, les tendons, les ligaments et la cornée.

La structure du collagène est tridimensionnelle, avec une torsion de trois types de fibres ce qui accroît la résistance de sa structure. La **Figure 3** montre la configuration spatiale de la triple hélice de collagène.

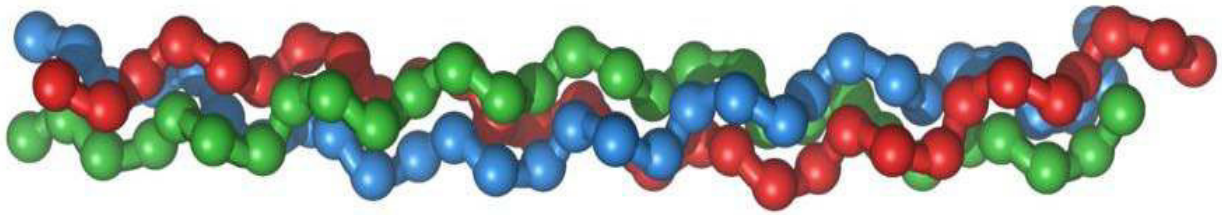


Figure 3. Structure tridimensionnelle du collagène

(Lien internet : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Collag%C3%A8ne>)

2.2.2.3 Propriétés physiques

En raison de la structure fibreuse particulière de la peau de chèvre et de la possibilité pour celle-ci d'être affectée par plusieurs facteurs, ce produit brut peut acquérir une vaste diversité de propriétés physiques, qui détermineront la qualité finale du produit.

2.2.2.3.1 Effet de l'O₂ atmosphérique

Quand le collagène vieillit, *in vivo* ou *in vitro*, l'oxygène atmosphérique joue un rôle important dans sa modification chimique (Sobel et Hansen, 1989). L'oxydation va changer la structure moléculaire des protéines, provoquant ainsi un "cross-linking" ou des modifications chimiques de plusieurs acides aminés au cours du temps. Ces changements sont aussi influencés par la quantité de graisse résiduelle.

2.2.2.3.2 Effet de l'humidité relative

L'eau affecte aussi le collagène, en le modifiant chimiquement à travers l'hydrolyse, la stabilité des ponts d'hydrogène et le taux de gélatine formé. La sorption de l'eau est impliquée dans les changements de dimension (gonflement) et la perméabilité du matériel (Hansen *et al.*, 1992). Une humidité relative supérieure à 75 % peut favoriser le développement de moisissures et le gonflement de la peau. En revanche, une humidité relative inférieure à 25 % peut provoquer son rétrécissement.

Bowes et Raistrick (1967) ont étudié l'effet de l'humidité relative et du pH sur l'hydrolyse du collagène. A 40 °C pendant 8 semaines, l'hydrolyse augmente avec l'humidité et la diminution du pH.

Il convient de signaler le phénomène de *gélatinisation* du collagène qui est, en fait, le résultat d'une dénaturation de la triple hélice au contact de l'eau. Le degré de dénaturation dépend des

fibrilles de collagène présentes dans la peau. Quand la structure de la fibre est déstabilisée ou quand les fibres sont cassées, le collagène devient, en outre, plus sensible aux attaques bactériennes (Rebricova et Solovyova, 1987).

2.2.2.3.3 Effet de la température

La stabilité thermique du collagène est une propriété importante pour la détermination de la qualité de la peau. Des températures basses ($< 12\text{ }^{\circ}\text{C}$) appliquées pendant de longues durées peuvent solidifier les graisses présentes dans la peau et jouer un rôle barrière vis-à-vis des échanges ambiants (Fredericks, 1997). Par ailleurs, si les fibres de collagène non détériorées sont stables jusqu'à $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, les fibres détériorées se rétréciraient à température ambiante (Nieuwenhuizen, 1998).

L'effet de la température de détérioration du collagène est au moins égal à la température provoquant le début du rétrécissement de la peau et connu sous le nom de 'shrinkage temperature' (Young, 1990).

Une étude comparant la perméabilité de la peau de rat et celle de chèvre vis-à-vis de cinq différents types d'huile a montré que la peau de chèvre aurait joué un rôle qualifié de "double peau", probablement lié à sa structure plus compacte et solide (Kazar et Pitchaimani, 2006).

2.2.2.4 Modes de conservation

La littérature révèle plusieurs modes de conservation chimique, comme le traitement de la peau à l'acide borique (Hughes, 1974), au chlorure de sodium (Bailey et Gosselin, 1996) et à la soude (Rao et Henrickson, 1983). Parmi les méthodes biocides, l'utilisation d'antibiotiques comme la tétracycline a été mise en place (Berwick *et al.*, 1996). Bailey (1997) a étudié les modes de conservation physiques tels l'irradiation par les rayons gamma. Une autre méthode de conservation des peaux de chèvre se fonde sur l'utilisation d'agents déshydratants comme le gel de silice (Kanagaraj *et al.*, 2002).

Afin de respecter l'environnement, le fait de traiter la peau au chlorure de sodium reste le mode le plus écologique.

2.2.2.5 Utilisations de la peau

Comme la chèvre figure parmi les premiers animaux domestiqués, l'homme a utilisé depuis très longtemps des peaux de chèvres domestiques. Malheureusement, il s'avère impossible de déterminer à quelle époque l'utilisation artisanale de ces peaux a réellement commencé.

Vers 4 500 ans av. J.-C., en Egypte, ainsi que dans d'autres régions, les peaux de chèvres servaient de linceul. Dans la tombe de *Toutankhamon*, on a retrouvé un tabouret dont le siège est en peau de chèvre daté de 1340 av J-C. Dans certains pays, depuis longtemps et jusqu'à présent, des outres à eau, à vin ou à huile sont toujours fabriquées en peau de chèvre. Dans les tabernacles des Hébreux, se trouvaient des rideaux tissés en poils de chèvre et les peaux tannées servaient de couverture pour les tentes. A une certaine époque, ces peaux ont servi à la fabrication de parchemin utilisé pour l'écriture ; ailleurs elles étaient utilisées pour la fabrication de voiles de bateaux après tannage à l'alun. Dans divers sites néolithiques, on a également découvert des fragments de cuir. Au Cameroun et au Nigeria, la peau de chèvre bouillie et consommée, était une tradition culinaire. Dans l'Antiquité, les peaux de chèvre servaient évidemment à confectionner des vêtements, ce qui prouve que le commerce actuel ainsi que les industries modernes du tannage et du cuir dérivent de l'une des plus anciennes formes de l'artisanat (French, 1971).

Il faut signaler que l'utilisation finale de ces peaux dépend de plusieurs facteurs tels que le poids, l'épaisseur, la composition et la forme, la pénétration du poil, la structure et la qualité du grain.

2.3 Observations sur le fromage *Darfiyeh* et l'Appellation d'Origine (AO)

Notre perception pour appréhender la réalité concrète du fromage *Darfiyeh* artisanal s'est appuyée sur la visite d'une dizaine de producteurs de *Darfiyeh*, généralement accompagnée d'entretiens avec les bergers et sur quelques points de vente localisés dans la région montagnarde Nord Libanaise.

2.3.1 Observations sur le *Darfiyeh*

2.3.1.1 Historique

2.3.1.1.1 Origine

Le fromage *Darfiyeh* est produit en utilisant des méthodes artisanales ancestrales. Le nom *Darfiyeh*, dérive de "*Dariff*", qui est la peau de la chèvre employée comme enceinte d'affinage. C'est un fromage typique des montagnes du Nord Liban connues pour leurs célèbres Cèdres millénaires appelées *Cèdres de Dieu*, d'où son nom, *fromage des Cèdres*.

Depuis la plus haute antiquité, le pays de Canaan, dont l'actuel Liban fait partie, était décrit maintes fois dans la bible comme "la terre du lait et du miel". Les Cananéens, peuple sédentarisé dès l'aube de l'histoire, dans un pays à la fois maritime et montagneux, ont su créer une gastronomie subtile. Les Libanais sont l'un des rares peuples du monde à savourer encore aujourd'hui un plat que leurs ancêtres dégustaient il y a quatre mille ans : "le chevreau cuit dans le lait de sa mère" (Dib, 2006).

On estime que cette tradition fromagère est ancrée dans les communautés du Mont-Liban depuis l'occupation ottomane qui s'est perpétuée entre le XV^{ème} et le XIX^{ème} siècles. Le Liban a régulièrement accueilli dans ses montagnes des communautés opprimées par les Turcs, les Arméniens, les Grecs orthodoxes, les Kurdes, ... Il faut signaler également que le fromage Tulum Turc s'affine dans la peau de chèvre (Güven *et al.*, 1995). Le *Darfiyeh* fait partie intégrante du patrimoine culturel et historique de la région montagnarde Nord Libanaise.

2.3.1.1.2 Zone de production et pâturages

Le Liban possède une vocation historique pour l'élevage, imposée par les conditions climatiques et géographiques du milieu. Il se caractérise par un massif montagneux, le Mont Liban. Couvert de forêts de cèdres, il est bordé d'étroites plaines littorales séparées par des promontoires rocheux. Les climats vont du tropical au montagnard en passant par le méditerranéen et le subdésertique (dans la plaine de la *Békaa*, à l'Est du Mont Liban).

Le *Darfiyeh* est produit par des techniques ancestrales qui en garantissent l'authenticité dans plusieurs régions du Liban Nord comme *Ehden*, *Bcharré Inata* et dans beaucoup d'autres (Figure 4).



Figure 4. Carte simplifiée du Liban montrant la zone de production du fromage *Darfiyeh*
(Lien internet : <http://www.interex.fr/fr/fiches-pays/liban/carte>)

Cette région dans le nord du pays est montagneuse (1 100 à 3 000 m d'altitude au dessus du niveau de la mer), caractérisée par un été sec (plus de six mois sans pluie) et un hiver très froid (Leipzig, 1996).

Les élevages extensifs sont toujours pratiqués. Des troupeaux de chèvres appartenant à la population locale ou "*Baladi*", broutent dans les pâturages sans aucun complément alimentaire. La végétation est typique des pays méditerranéens. Plusieurs sources d'eau fraîche sont disponibles.

Les grottes destinées à l'affinage du *Darfiyeh* bénéficient du climat de cette région montagnarde, lui conférant ainsi un environnement propice à son vieillissement. Ce genre de fromage réclame la contribution familiale des fermiers. Les méthodes de fabrication fermière du *Darfiyeh* sont nombreuses et diffèrent d'un village à un autre. Chaque producteur possède son tour de main et son savoir-faire, qu'il tire de ses propres conditions locales de fabrication et des traditions héritées des générations précédentes. Malgré des conditions de production rustiques, le fromage *Darfiyeh*, porteur de l'identité de toute une région, est recherché malgré sa "clandestinité".

2.3.1.2 Consommation et commercialisation

Le *Darfiyeh* est très apprécié dans les villages du Liban Nord. Sa consommation s'est développée surtout dans les villages de montagne (*Ehden-Bcharré-Inata*) où l'élevage caprin extensif est assez répandu (18 % du troupeau caprin libanais). Considéré comme un produit prestigieux, il est essentiellement consommé par les fermiers eux-mêmes lors d'occasions particulières. A part les consommateurs de la population rurale, la catégorie socio-professionnelle aisée est également consommatrice de *Darfiyeh*. Il reste à signaler aussi que ce fromage est emblématique de la région touristique Nord Libanaise car chaque touriste veut repartir avec son fromage.

En raison de la production saisonnière du lait de chèvre, les produits caprins frais n'existent que périodiquement sur le marché. Leur commercialisation se fait principalement sur les marchés locaux avec une quantité minimale vendue dans les grandes et moyennes surfaces. La longue durée de conservation du *Darfiyeh*, dépassant les six mois, permet une disponibilité de vente hors saison et lui confère la possibilité d'être consommable tout au long de l'année, d'où la préoccupation de l'éleveur vis-à-vis de ce type de transformation. Donc, les fermiers qui s'efforcent de créer une clientèle actuellement limitée essaient de mieux valoriser leur produit en le commercialisant hors saison, ce qui leur offre une capacité de report importante.

Cependant, ce fromage reste faiblement commercialisé. Mais il est pourtant omniprésent dans les rues de *Ehden*, *Bcharré* et dans les restaurants de la région. Il est essentiellement vendu par les fermiers dans la zone de production, sans aucune intervention commerciale ou publicitaire. Cette vente se fait directement à la boucherie (le père de la famille est le plus souvent boucher) ; les consommateurs effectuent un trajet parfois d'une heure de route pour acheter ce fromage.

La commercialisation de ce produit traditionnel au lait cru n'est pas autorisée et son caractère "clandestin" nuit au développement de son marché. Il est presque absent des lieux de distribution et des points de vente et rarement présent dans les rayons des boutiques ou des supermarchés de la région urbaine.

Le *Darfiyeh*, par son prix de vente relativement élevé, est un produit haut de gamme ; le kg vaut environ 40 000 L.L, ce qui équivaut à 20 €. Par comparaison avec le prix du *Comté* affiné pendant 8 mois, qui vaut 13 € le kg en grande surface en France, le *Darfiyeh* est aujourd'hui le plus cher des fromages du marché libanais. Il est donc, de fait, accessible seulement aux producteurs et aux consommateurs aisés.

2.3.1.3 Tentatives de sauvegarde

En partenariat avec l'association internationale SFFD (*Slow Food Foundation For Biodiversity*), la FRM (*Fondation René Moawad*) s'est engagée dans un projet pilote destiné à contribuer au développement des zones rurales. La SFFD est un mouvement né en Italie pour promouvoir un nouveau modèle de développement agricole durable. Il s'agit de lancer la production du *Darfiyeh*, dont la tradition est en train de se perdre dans le Nord Liban. Le but de l'opération est de permettre aux éleveurs de tirer profit de la production d'un fromage à haute valeur ajoutée, à condition de suivre des règles d'hygiène et de production jusque-là peu respectées. Le projet *Darfiyeh* appelé "*sentinelles du goût*" est le premier projet soutenu au Liban par la SFFD dont la mission est de préserver les traditions culinaires ancestrales en voie de disparition tout en contribuant à assurer des sources de revenus et d'emplois à la population de certaines régions menacées par l'exode rural. Le *Darfiyeh* est le seul produit agricole au Liban et au Moyen-Orient à bénéficier de la note "*Presidia*", livrée par la SFFD.

En partenariat avec l'USEK (*Université Saint-Esprit de Kaslik*), la FRM s'est engagée à valoriser d'une façon durable le *Darfiyeh* traditionnel par ses caractérisations physico-chimique et microbiologique, en vue de la création d'une appellation d'origine qui préservera l'authenticité de ce fromage tout en contribuant au développement de la région montagnarde Nord Libanaise.

2.3.2 Observations sur les Appellations d'Origine (AO)

2.3.2.1 Introduction

Par nature, tout produit alimentaire a une origine géographique. Historiquement, les habitudes de consommation alimentaire sont marquées par des facteurs socio-culturels et par des ressources naturelles locales. Ces liens entre l'aliment et le terroir ont disparu avec le temps pour plusieurs raisons, dont les changements des technologies de production, l'urbanisation et l'exposition du consommateur à des expériences acquises au travers des voyages et des médias (Montanari, 1994).

Cependant, au cours des dix dernières années, les aliments bénéficiant d'une origine géographique bien déterminée ont particulièrement attiré le consommateur pour les qualités organoleptiques et culinaires spécifiques associées aux produits régionaux, la santé, le patriotisme et l'attention livrée par les médias.

Cette partie est consacrée à l'aspect législatif et réglementaire des dénominations d'origine, aux techniques analytiques adaptées pour déterminer l'origine géographique des produits alimentaires et plus particulièrement aux liens entre la biodiversité des fromages et les facteurs de production.

2.3.2.2 Réglementation, importance et enjeux d'une AO

2.3.2.2.1 Réglementation et désignation

En 1992, la réglementation Européenne 2081/92 et 2082/92, remplacée récemment par les réglementations 510/2006 et 509/2006, ont permis l'application des indications géographiques suivantes à un produit alimentaire : Appellation d'Origine Protégée (AOP), Indication Géographique Protégée (IGP) et Spécialité Traditionnelle Garantie (STG) (Mout, 2004).

L'AOP désigne la dénomination d'un produit dont la production, la transformation et l'élaboration doivent avoir lieu dans une aire géographique déterminée avec un savoir-faire reconnu et constaté. L'AOP pourra éventuellement être remplacée par la mention AOC, comme le *Roquefort* français.

L'IGP d'un produit désigne le lien avec le terroir qui demeure à un des stades au moins de la production, de la transformation ou de l'élaboration, comme le pain italien *Coppia Ferrarese*.

La STG ne se réfère pas à l'origine, mais permet de valoriser le caractère traditionnel d'un produit, comme dans le cas du fromage italien, *la Mozzarella*.

2.3.2.2.2 Importance

La dénomination d'origine est une information claire pour le consommateur de l'origine des produits issus de l'élevage ou de l'agriculture. Elle permet à ce produit, distingué pour sa renommée et la régularité de sa qualité, de devenir l'ambassadeur d'un savoir-faire régional. C'est une garantie pour le producteur dont le but est d'assurer l'équilibre du marché, entre l'offre et la demande. Ces AO favoriseront les liens entre agriculteurs, agronomes, paysagistes, environnementalistes, élus et consommateurs.

La notoriété de cette appellation fait présumer certaines qualités caractéristiques du produit qu'elle désigne. Elle permet de reconnaître des produits qui tirent leurs caractéristiques du terroir d'origine. C'est ce terroir, dans sa complexité intégrant les facteurs humains avec les usages et le savoir-faire de l'homme, qui s'exprime au travers du produit (Albisinni et Venzi, 2000). En tant

que fondement d'une AOC, le « terroir » se doit d'être protégé ; il s'agit en réalité d'un concept géographique et agronomique. Le terroir est surtout associé au sol et au climat. L'importance économique du « terroir », considéré comme une puissance de production, s'avère indispensable dans la détermination de la valeur des produits agricoles.

2.3.2.2.3 Enjeux

Du point de vue des AO, les enjeux principaux sont liés à la nécessité de prouver la spécificité des produits en explicitant les liens particuliers qu'ils entretiennent avec le territoire sur lequel ils sont produits ou transformés. Il convient de définir les "usages locaux" qui doivent être maintenus et les évolutions acceptables pour profiter des meilleures découvertes technologiques et faciliter le travail des agriculteurs de moins en moins nombreux. Enfin, il est nécessaire de répondre à l'ensemble des nouvelles demandes sociétales, notamment celles qui concernent la qualité de l'environnement et des paysages (Branlard, 1995).

2.3.2.3 Démarches législatives françaises

En France, un fromage ne peut obtenir une AO que par décret ministériel. L'obtention d'une AO constitue la reconnaissance de toute une démarche qui s'opère sous le contrôle de l'Institut National de l'Origine et de la Qualité (INAO), anciennement Institut National des Appellations d'Origine. L'INAO est un établissement public à caractère administratif, placé sous la tutelle du Ministère de l'Agriculture.

Sous l'angle législatif, les dispositions de lois relatives au Code de la Consommation et au Code Rural, pour la protection des indications géographiques et des appellations d'origine des produits agricoles et des denrées alimentaires, sont respectées.

Selon l'encadrement réglementaire, seuls ont droit à une AO, les fromages qui respectent les trois critères suivants:

- Une méthode de fabrication traditionnelle ;
- Une zone géographique d'origine délimitée en fonction des caractères naturels (flore, relief);
- Un contrôle qualitatif du produit fini qui exige le respect des critères suivants (taux de matières sèches, taux de matières grasses, profil des acides gras, flore microbienne, ...), de ses qualités organoleptiques et de sa présentation.

La France est le leader mondial de la fabrication des fromages de chèvre avec plus de 86 027 tonnes produites en 2006, en laiterie ou à la ferme. La variété des terroirs et leur typicité

naturelle conditionnent la personnalité, la diversité et la richesse des saveurs caractéristiques de la grande famille des fromages de chèvre. Parmi ces derniers, le *Picodon*, le *Rocamadour*, le *Banon*, le *Pélardon*, le *Chabichou du Poitou*, le *Chevrotin*, le *Crottin de chavignol*, le *Mâconnais*, le *Poulligny-St-Pierre*, la *Sainte-Maure* de Touraine, le *Valençay* et autres sont des traditions fromagères de qualité bénéficiant d'une appellation d'origine en France.

2.3.2.4 Description d'un fromage bénéficiant d'une AO

Cette section est inspirée de la description du Rocamadour français, fromage de chèvre au lait cru bénéficiant d'une AOC (LégiFrance, JORF, N 174), adaptée aux conditions de fabrication et d'affinage du Darfiyeh, afin de concrétiser la démarche d'obtention d'une AO auprès du Ministère de l'Economie, des Finances, de l'Industrie et de l'Agriculture Libanaise.

Le fromage Darfiyeh bénéficiant d'une AO doit respecter les principales dispositions suivantes :

- L'AO "Darfiyeh" est réservée aux produits fabriqués dans les montagnes Nord Libanaises ;
- Le lait utilisé doit provenir des chèvres locales, comme il peut également provenir d'un élevage implanté dans ce même secteur. Un agrément officiel des services vétérinaires est obligatoire ;
- Seul le Dariff des chèvres locales peut être utilisé comme enceinte d'affinage ;
- Après égouttage manuel lui donnant sa forme définitive, le Darfiyeh frais pèse entre 400 et 500 g. Il renferme au minimum 40 g de matière grasse pour 100 g de produit après dessiccation (Serhan *et al.*, 2007) ;
- Le lactosérum utilisé pour produire l'*Arichi* doit provenir de l'égouttage des fromages *Darfiyeh*, de même que seul le lactosérum frais doit être utilisé et la méthode de chauffage doit être directe ;
- La durée d'affinage du *Darfiyeh* doit varier entre 1 et 3 mois ;
- Enfin, le qualificatif "*Darfiyeh* fermier" est réservé aux producteurs transformant sur leur exploitation artisanale, tout en respectant les normes d'hygiène.

2.3.2.5 Techniques analytiques pour déterminer l'origine géographique

L'utilisation des indications géographiques permet aux producteurs de se reconnaître sur le marché. Une fausse utilisation des indications géographiques par des organismes non autorisés est nuisible à la fois pour le consommateur et le producteur. De ce point de vue, le développement continu de techniques analytiques sophistiquées pour la détermination de l'origine géographique de produits agricoles s'avère inévitable. Ce défi analytique est en

progression continue depuis les années 80. Les premiers produits d'intérêt étaient le vin, le miel, le thé, l'huile d'olive et le jus d'orange.

Ces approches analytiques ont été divisées en quatre groupes : techniques de spectrométrie de masse, techniques de spectroscopie, techniques de séparation et autres techniques décrites dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Panorama des techniques analytiques qui peuvent être utilisées pour la détermination de l'origine géographique des produits alimentaires

Méthodes	Technique analytique spécifique
Spectrométrie	Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse Couplage plasma inductif - spectrométrie de masse Ratio isotopique - spectrométrie de masse Transfert de protons - spectrométrie de masse
Spectroscopie	Résonance Magnétique Nucléaire Spectroscopie d'absorption atomique Spectroscopie de fluorescence Spectroscopie Infra Rouge
Séparation	Chromatographie liquide haute performance Chromatographie en phase gazeuse Electrophorèse capillaire
Autres	Technologie de détection Technologie de l'ADN Analyses sensorielles

Source : Luykx et van Ruth (2008)

Les deux techniques utilisées au cours de ce travail sont la chromatographie en phase gazeuse et les techniques de biologie moléculaire. Actuellement, une grande importance est attachée à l'analyse de la composition des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (Collomb *et al.*, 2002 ; Castillo *et al.*, 2007) et à la diversité *microbienne* par des techniques de biologie moléculaire des produits laitiers (Monnet *et al.*, 2006 ; Licitra *et al.*, 2007).

Il convient de rappeler que le *Darfiyeh* s'affine dans la peau de chèvre, celle-ci étant considérée comme un emballage naturel. La section suivante portera sur les interactions entre aliment-emballage-environnement.

2.4 Interactions aliment-emballage-environnement

2.4.1 Introduction

La conservation d'un produit alimentaire emballé dépend principalement du maintien de ses qualités d'origine en le protégeant contre les influences extérieures détériorantes. L'Administration Américaine des Denrées Alimentaires et des Médicaments, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESAs), et l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) définissent un matériau d'emballage comme tout contenant ou tout matériau de stockage qui sert à la préparation et/ou au stockage des denrées et dont la surface entre en contact avec des aliments.

Cette protection désirée du produit alimentaire est rendue possible grâce aux "propriétés barrière" du matériau d'emballage. Ce dernier peut être une simple couche de polymère, ou un film multicouches incluant différents polymères. Ces "propriétés barrière", et par conséquent la capacité de protection d'un emballage, proviennent principalement de la perméabilité aux gaz et à la vapeur qui influencent la qualité du produit (Jeantet *et al.*, 2007). Cependant, la "barrière" absolue n'existe pas. Il est alors nécessaire de connaître les propriétés physiques de cette barrière, sa perméabilité aux gaz, aux composés aromatiques et aux vapeurs de l'environnement, ainsi que ses interactions avec l'aliment et l'environnement.

Les interactions aliment-emballage-environnement ont fait l'objet d'une attention soutenue et sont étudiées depuis une dizaine d'années pour parvenir à leur maîtrise (Fayoux *et al.*, 1997 ; Strathmann *et al.*, 2005 ; Cayot *et al.*, 2008). Ainsi la connaissance des aspects théoriques de ces interactions est nécessaire.

2.4.2 Perméation, migration et absorption

Les interactions aliment-emballage-environnement sont définies comme étant un transfert de masse ou d'énergie entre l'aliment, l'emballage et l'environnement, ce qui pourra avoir un effet sur l'aliment, et/ou sur l'emballage. Les processus de transfert dans les systèmes d'emballage sont la *perméation*, la *migration* et l'*absorption* (**Figure 5**).

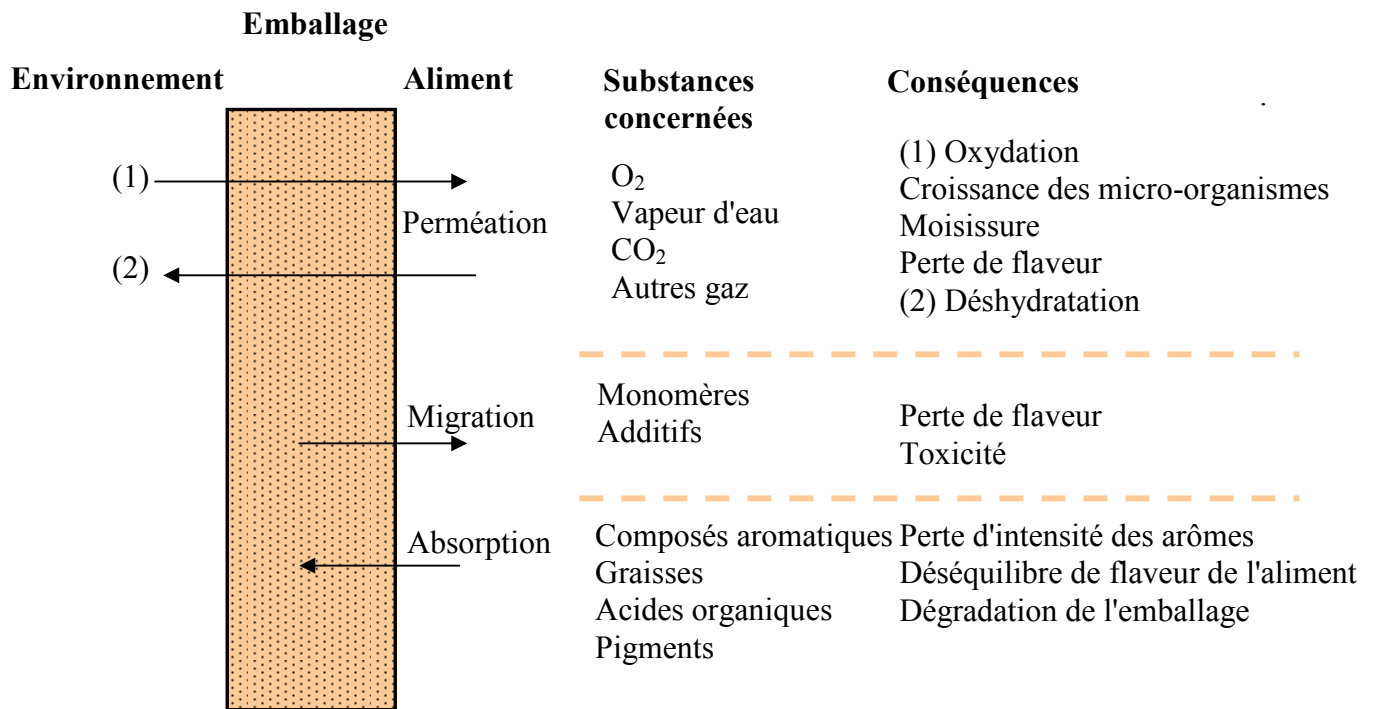


Figure 5. Interactions possibles entre aliment-emballage-environnement, les substances concernées et les conséquences correspondantes (adapté de Nielsen et Jägerstad, 1994)

La *perméation* est définie comme le transfert de molécules de gaz ou de vapeur d'eau ou de composés volatils à travers un matériau dense. Ce phénomène se produit quand une membrane sépare deux phases homogènes en équilibre thermodynamique, ayant chacune une concentration (ou potentiel chimique) différente. Les molécules de pénétrant de la phase qui a la concentration la plus élevée, tendent à diffuser à travers la membrane pour atteindre l'autre phase et équilibrer ainsi les concentrations. Quezada-Gallo *et al.* (1999) ont observé les interactions entre les composés aromatiques et des films comestibles ; la perméabilité des films de méthylcellulose et de LDPE (polyéthylène basse densité) à des cétones méthylées a été étudiée.

La *migration* correspond au transfert de substances provenant du matériau d'emballage vers le produit emballé par des effets de nature physico-chimique, à l'exclusion des éléments qui pourraient se dissocier de l'emballage sous l'effet de contraintes mécaniques (Jeantet *et al.*, 2007). La migration des composés est en relation directe avec la santé humaine, en raison du passage des résidus de polymérisation de l'emballage vers le produit alimentaire. La migration de molécules chimiques modèles depuis l'emballage vers la matrice fromagère a fait l'objet de plusieurs travaux récents (Cruz *et al.*, 2008 ; Délérès *et al.*, 2008 ; Overington *et al.*, 2008). La migration de trois molécules modèles à travers le polymère LDPE (polyéthylène basse densité)

vers le fromage Gouda a été étudiée par Cruz *et al.* (2008). Les expériences ont été conduites au moyen de solutions simulées avec des taux différents de matière grasse et d'eau, conservées à deux températures différentes (5 °C et 25 °C). Ces auteurs constatent que la teneur en matière grasse n'est pas le seul facteur influençant la migration des agents lipophiles à partir de l'emballage vers le fromage. D'autres facteurs, comme le rapport matière grasse/eau et la consistance de l'aliment, jouent un rôle important dans le processus entier de transfert.

Dans le cadre de notre étude, la *migration* ne sera pas explicitée car la peau de chèvre utilisée comme enceinte d'affinage du *Darfiyeh* est considérée comme un emballage naturel.

L'absorption est le transfert des composés contenus à l'origine dans l'aliment et leur diffusion dans l'emballage. Ces composés peuvent pénétrer dans la structure du matériau d'emballage, provoquant une perte de flaveur et un changement dans les propriétés physiques et mécaniques de l'emballage réduisant ainsi la qualité du produit alimentaire (Johansson, 1993). Ce processus s'établit en deux phases : dans une première étape, le composé aromatique est adsorbé dans le polymère, alors qu'il se dégrade rapidement dans une solution aqueuse d'éther diéthylique ; dans une seconde étape, et quand la concentration de ce composé dans cette solution est proche de zéro, le polymère libère progressivement les composés aromatiques adsorbés vers l'aliment (Reynier *et al.*, 2004).

Le phénomène d'absorption des composés aromatiques par l'emballage a été très bien détaillé dans la littérature (Fayoux *et al.*, 1997 ; Van Williage *et al.*, 2000 ; Caner, 2004 ; Strathmann *et al.*, 2005 ; Dury-Brun *et al.*, 2008b). L'absorption de trois méthylcétones (2-heptanone, 2-octanone et 2-nonanone), d'esters éthylés et de terpènes par des films comestibles composés essentiellement de polysaccharides et de protéines d'origine végétale a été étudiée par Quezada-Gallo *et al.* (2000). L'interaction entre l' α -pinène et le butyrate d'éthyle en fonction de l'humidité environnante, à travers des films d'EVOH (éthylène vinyle alcool) a été explicitée par Lopez-Carballo *et al.* (2005). Récemment, le transfert de l'hexanoate d'éthyle dans du papier et dans des polymères, a été élucidé par le biais des mécanismes de sorption et de perméation (Dury-Brun *et al.*, 2008b).

La *perméabilité* et l'*absorption* sont les deux types d'interactions qui feront l'objet d'une attention soutenue dans le cas de notre étude.

2.4.3 Aspects théoriques des processus de transfert de matière

Le transfert de matière à travers un matériau d'emballage se déroule en plusieurs étapes (**Figure 6**). Les molécules entrent d'abord en collision avec la surface du matériau d'emballage, puis elles sont adsorbées et se dissolvent dans la masse du matériau. Dans celui-ci, les molécules diffusent au hasard, selon leur énergie cinétique dans des discontinuités, comme les pores, les micro-trous et les fissures au niveau de l'emballage et se déplacent progressivement, selon la structure du matériau. Le mouvement de ces molécules dépend de la disponibilité de ces discontinuités dans la masse de l'emballage (Singh et Heldman, 1993).

L'absorption englobe les deux premières étapes du processus de transfert, l'adsorption et la diffusion ; la perméation englobe les trois étapes (Delassus, 1997).

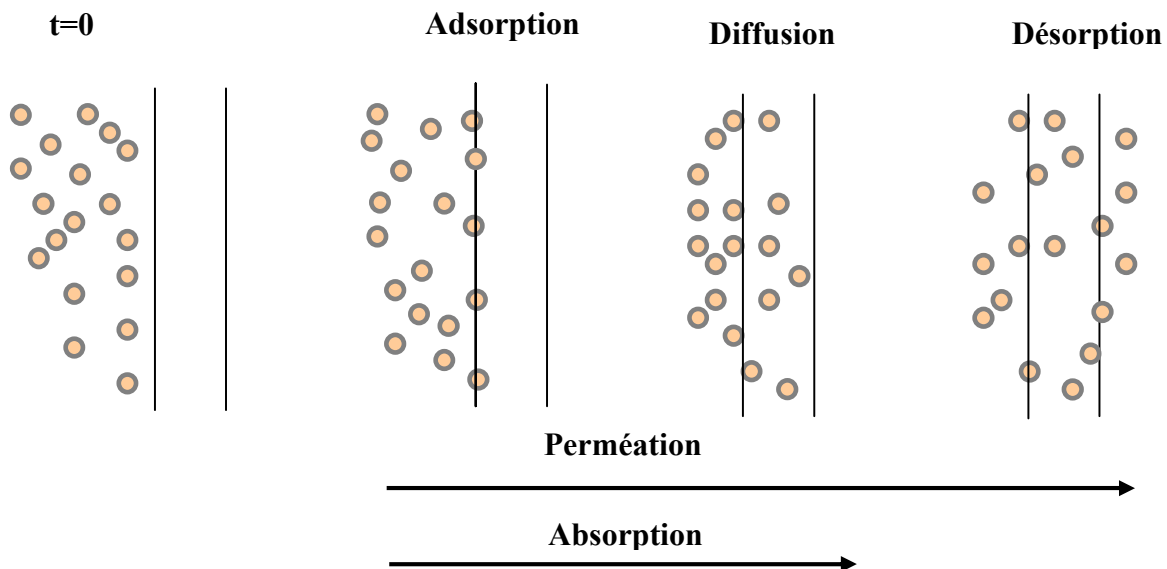


Figure 6. Transfert de masse des molécules à travers un matériau d'emballage (adapté de Delassus, 1997)

Pour l'étude des transferts de matière à travers des emballages, la connaissance des coefficients de diffusion, de partage, de solubilité et de perméabilité est nécessaire.

2.4.3.1 Migration

Le risque de migration moléculaire dans un système emballage-aliment est important du point de vue économique et sanitaire. Ces migrants pourraient être des composés volatils, des additifs, des monomères et/ou des oligomères. Le terme "*migration*" est à l'origine de deux mécanismes (la

diffusion et le partage), qui pourraient être importants dans la détermination de la concentration des contaminants dans un système alimentaire.

2.4.3.1.1 Coefficient de diffusion

La diffusion est un processus physique dans lequel le transfert de masse est dû au gradient de concentration. Elle est caractérisée par une mesure quantitative du taux exprimée sous le terme de diffusivité ou coefficient de diffusion (Schwartzberg et Chao, 1982). La première loi de Fick permet d'évaluer les valeurs théoriques de diffusivité. La première loi est basée sur l'hypothèse que le taux de transfert d'un composé à travers une surface est proportionnel au gradient de concentration mesuré.

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

où, J, est le taux de transfert par unité de surface ($\text{kg. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), C, est la concentration de la substance diffusante (kg. m^{-3}), D, est le coefficient de diffusion ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), x, est l'abscisse considéré dans le transfert unidirectionnel (m).

Le coefficient de diffusion est un paramètre cinétique qui correspond à la vitesse de transfert. Il reflète la facilité avec laquelle une molécule de pénétrants se déplace dans un milieu continu et isotrope. A signaler que la concentration des pénétrants, le poids moléculaire, la solubilité, le temps, la température, les compositions de la membrane et de l'aliment, la structure (densité, cristallinité, branchement des chaînes) sont les principaux facteurs affectant la diffusion (Gilbert *et al.*, 1980).

2.4.3.1.2 Coefficient de partage

Le coefficient de partage est la distribution d'une substance diffusante (pénétrant) entre la phase en contact avec la membrane et la membrane elle-même, à l'équilibre thermodynamique. Cette distribution est décrite par la fonction de Nernst :

$$K = \frac{C_m}{C_a}$$

où K , est le coefficient de partage du pénétrant entre la phase et la membrane, C_m , est la concentration du pénétrant dans la membrane (kg. m^{-3}), C_a , est la concentration du pénétrant dans la phase en contact avec la membrane ou l'aliment.

Plusieurs facteurs comme le pH, la structure et la taille moléculaire, la teneur en matière grasse et le degré de cristallinité affectent le coefficient de partage et par la suite affectent l'équilibre d'une molécule entre l'aliment et son emballage (Tehrany et Desobry, 2004).

2.4.3.2 Sorption et coefficient de solubilité

Pour les gaz et les vapeurs, à l'équilibre et pour une température constante, la concentration du pénétrant dans la membrane (mol. m^{-3}), C , est reliée à sa pression partielle par l'équation suivante :

$$C = S \cdot p$$

où p , est la pression partielle du pénétrant (Pa) et S , est le coefficient de solubilité ($\text{mol.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$).

Le coefficient de solubilité est un paramètre thermodynamique déterminé à l'équilibre. Lorsque S est indépendant de la concentration du pénétrant dans la membrane et de sa pression partielle (par exemple, à très faibles concentrations), la relation entre c et p devient linéaire et S correspond au coefficient de solubilité de la loi de Henry.

Le coefficient de solubilité S est la grandeur thermodynamique du transport global. Il représente la quantité de molécules de gaz dissoutes dans la membrane dans les conditions d'équilibre. Il est lié aux interactions gaz/polymère et au volume libre de la membrane.

Les paramètres de solubilité (δT) de Hansen (1967) sont reliés aux forces de dispersion de Van der Waals (δD), aux interactions des dipôles (δP) et aux liaisons hydrogènes (δH). Ces paramètres sont largement utilisés pour prédire l'affinité des composés pour les polymères.

$$\delta_T = \sqrt{\delta_D^2 + \delta_P^2 + \delta_H^2}$$

2.4.3.3 Permeabilité et coefficient de permeabilité

La perméabilité est une caractéristique déterminante de l'emballage, qui conditionne le transfert de matière au travers du matériau le constituant. Ces transferts peuvent se produire en phase

liquide, ou plus généralement en phase gazeuse (gaz, vapeurs et autres substances volatiles) (Jeantet *et al.*, 2007).

Le coefficient de perméabilité (P), comprend à la fois les propriétés cinétiques et thermodynamiques du système membrane-pénétrant et est le produit des coefficients de diffusion (D) et de solubilité (S).

$$P = D \cdot S$$

Plusieurs paramètres influencent la perméabilité, comme les propriétés du matériau, les propriétés physico-chimiques des molécules diffusantes et les conditions environnementales.

2.4.4 Sorption des composés par l'emballage

Le transfert de composés de l'aliment vers l'emballage, fondé sur des mécanismes de sorption, a été très bien explicité dans la littérature et a requis une attention considérable (Dekker *et al.*, 2003 ; Reynier *et al.*, 2004). Ces composés peuvent être des substances volatiles et/ou non volatiles. La sorption des substances non volatiles, comme la graisse et les pigments, affecte l'emballage lui-même, alors que la sorption des substances volatiles affecte directement l'aliment suite à un déséquilibre de la flaveur (Sadler et Braddock, 1990).

2.4.4.1 Mesure du degré de sorption

Il existe différentes méthodes permettant de mesurer le degré de sorption des composés aromatiques par l'emballage. La solubilité des vapeurs est normalement décrite par le coefficient de solubilité du diffusant dans l'emballage. Charara *et al.* (1992) ont étudié la perte des composés aromatiques exprimée en pourcentage de la quantité initialement présente dans la phase aqueuse. Tehrany et Desobry (2007) ont calculé le coefficient de partage du diffusant entre l'emballage et la phase aqueuse du système. La proportion de distribution est un autre paramètre qui a été utilisé pour décrire le degré de sorption. Cette proportion est définie comme étant le rapport entre la quantité adsorbée par l'emballage et celle restant dans la solution initiale de départ (Nielsen et Jägerstad, 1994).

2.4.4.2 Paramètres affectant l'absorption des composés par l'emballage

L'analyse de l'absorption des composés aromatiques de l'aliment vers l'emballage est une considération importante, tant du point de vue sécurité alimentaire que du point de vue économique.

La **figure 7** montre les différents facteurs pouvant affecter l'absorption des composés aromatiques par l'emballage (Van Willige *et al.*, 2000). La distribution des molécules diffusantes entre l'aliment et l'emballage implique la connaissance des propriétés physico-chimiques de ces molécules comme la masse moléculaire, le point d'ébullition, la polarité, la solubilité, la concentration, etc. Les propriétés du matériau d'emballage (nature, dimensions, propriétés physico-chimiques, caractéristiques techniques, flore initiale, etc) ainsi que celles de la matrice alimentaire (structure physico-chimique, teneur en eau et en matières grasses, pH, etc) affectent également cette distribution. Il convient d'ajouter que la température et la durée de stockage sont deux facteurs principaux qui pourront agir sur le système aliment-emballage-environnement.

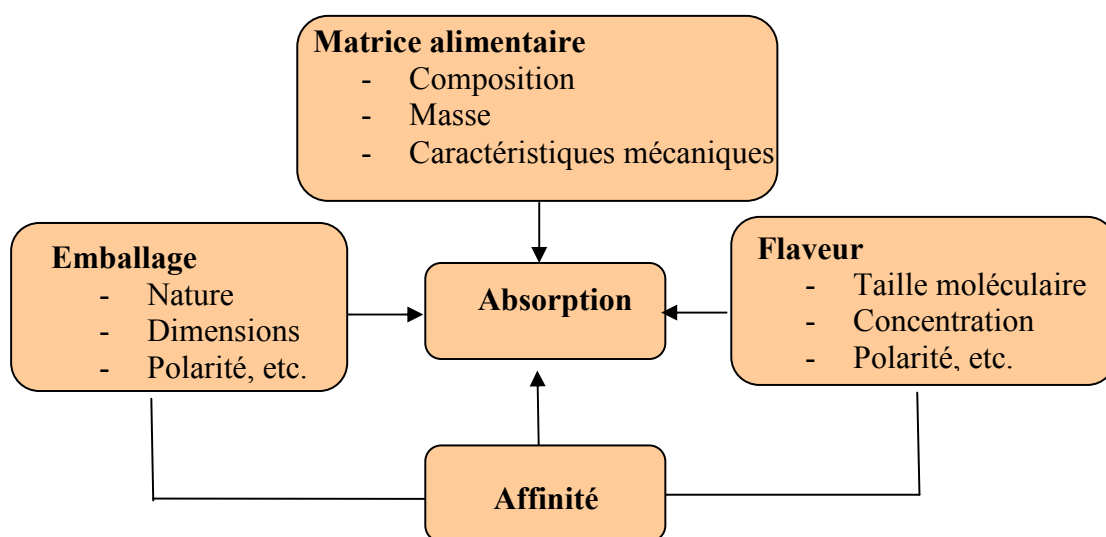


Figure 7. Facteurs affectant l'absorption des composés aromatiques par l'emballage (d'après Van Willige *et al.*, 2000)

2.4.4.2.1 Conditions environnementales

Le contrôle des conditions environnementales (température et humidité relative) est un facteur principal dans le maintien de l'intégrité du système aliment-emballage durant le stockage.

Plus particulièrement, le taux d'absorption des composés aromatiques par l'emballage s'est avéré affecté par la température du système aliment-emballage. Certains cas étudiés dans la littérature

(Nielsen *et al.*, 1992b ; Mujiburohman et Feng, 2007), ont permis d'expliciter l'effet de la température sur la solubilité et la diffusion des composés aromatiques à travers des membranes. En faisant varier la température de 75 à 5 °C, Nielsen *et al.* (1992b) ont pu observer une augmentation significative de la mobilité des molécules aromatiques diffusantes, couplée au changement dans la configuration d'un emballage LDPE (polyéthylène basse densité). Une augmentation de la température induit une solubilité et une diffusion des composés à travers des membranes. L'absorption du propyl propionate dans un système propyl propionate/eau par des membranes de PEBA (polyéther-block-polyamide) (Mujiburohman et Feng, 2007) est influencée par la température.

D'une part, une augmentation de la température rend les molécules plus mobiles : la perméation va augmenter grâce à l'augmentation de la diffusion. D'autre part, une augmentation de la température facilite le mouvement thermique des chaînes de polymères en terme de fréquence et d'amplitude, ce qui pourra induire et faciliter la diffusion des molécules à travers les membranes.

2.4.4.2.2 Propriétés physico-chimiques des molécules diffusantes

La distribution des molécules diffusantes dans un système aliment-emballage est dépendante de leurs propriétés physico-chimiques, comme la masse moléculaire, le point d'ébullition, la polarité, les liaisons hydrogènes, la solubilité, les pourcentages d'oxygène et d'hydrogène, le logP, etc.

Il a été observé que des molécules de grande taille sont plus facilement absorbées que des molécules plus petites (Shimoda *et al.*, 1988) et les molécules branchées sont mieux absorbées que les molécules linéaires (Halek et Chan 1994). Les composés ayant une masse moléculaire élevée ont une solubilité aqueuse faible, ainsi qu'un LogP élevé, parce que la plupart des composés ayant une masse moléculaire élevée sont hydrophobes (Jouquand *et al.*, 2004).

Le point d'ébullition d'un composé est prédéterminé par ses interactions dans un liquide. On suppose qu'il est alors lié directement à la structure chimique de la molécule. Un composé ayant le point d'ébullition le plus faible, est considéré le plus volatil.

La longueur de la chaîne carbonée est liée au point d'ébullition de la molécule diffusante ; plusieurs auteurs ont rapporté une relation entre la solubilité et le point d'ébullition des molécules diffusantes. Strandburg *et al.* (1990) ont montré une relation linéaire entre l'augmentation du point d'ébullition et le coefficient de solubilité des esters, des alcanes et des cétones linéaires. Les esters et les aldéhydes sont mieux absorbés que les alcools (Charara *et al.*,

1992). Les cétones sont plus absorbées que les esters et les aldéhydes. Plus la chaîne carbonée est longue, moins elle est polaire et, par voie de conséquence, ces composés sont plus absorbés par les emballages non polaires.

Dans une même série de composés volatils, la volatilité augmente quand la longueur de la chaîne aliphatique diminue et que la température augmente. Dans une même série de composés possédant le même nombre d'atomes de carbone, la volatilité dépend non seulement de la température ou de la masse moléculaire, mais aussi du groupement fonctionnel de la molécule. A une température déterminée, la volatilité des composés qui ont le même nombre d'atomes de carbone diminue comme suit : ester > cétone > aldéhyde > alcool > lactone (Covarrubias-Cervantes *et al.*, 2004).

Les composés organiques polaires ont tendance à avoir une solubilité aqueuse élevée, alors que les composés organiques moins polaires sont moins solubles dans l'eau. Le nombre d'atomes peut être une indication de la proportion d'atomes polaires et non polaires, comme l'oxygène et l'hydrogène (Ertl *et al.*, 2000).

Le logP permet d'appréhender le caractère hydrophobe (lipophile) ou hydrophile d'une molécule. En effet, si LogP est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère hydrophobe et inversement (Rekker, 1977 ; Hansch et Leo, 1979).

2.4.4.2.3 Matrice alimentaire

La nature de la matrice alimentaire joue un rôle important dans la détermination de la proportion des molécules diffusant à travers l'emballage. Comme la plupart des produits alimentaires, les produits laitiers sont des émulsions de graisse et d'eau, la quantité de matière grasse constituant un paramètre essentiel. Les aliments riches en matière grasse perdent moins de composés aromatiques par absorption que les aliments qui en contiennent moins, en raison du caractère lipophile de la plupart des composés aromatiques (Van Willige *et al.*, 2000). Ceci est attribué à une plus grande résistance au transfert de matière dans la phase huileuse que dans la phase aqueuse.

Il faut ajouter que le pH d'un système aliment-emballage influence l'absorption des composés aromatiques à travers l'emballage. Dans un système à pH acide, les alcools ont un coefficient de partage K plus élevé que celui des esters et des aldéhydes ; le pH affecte la polarité de ces

composés, la solubilité et la structure de la molécule diffusante et, par la suite, l'équilibre du système aliment-emballage (Nielsen *et al.*, 1992a).

Des composés aromatiques se trouvant dans un système d'aliment simulé sont plus absorbés en comparaison de ceux présents dans une matrice alimentaire réelle. L'augmentation du nombre de sites de sorption, la compétition entre sites, ainsi que la saturation due à une concentration plus élevée dans un système alimentaire réel, permettent de diminuer le coefficient de partage K (Nielsen *et al.*, 1992b).

2.4.4.2.4 Propriétés de l'emballage

Les caractéristiques du ou des matériaux constitutifs de l'emballage conditionnent ses fonctions et doivent donc permettre de ralentir l'évolution physico-chimique et microbienne dans la matrice alimentaire. Celle-ci présente au moment de son conditionnement un certain nombre de caractéristiques mesurables (acidité, indice de peroxyde, composition aromatique, texture, ...) pour lesquelles il est possible de déterminer une valeur limite au-delà de laquelle elle sera considérée comme non-conforme. Par ailleurs, le produit alimentaire peut constituer un excellent milieu nutritif pour les micro-organismes. La nature, les dimensions (épaisseur, surface), les propriétés physico-chimiques, les caractéristiques techniques, ainsi que la flore initiale caractérisant l'emballage agissent sur le processus d'absorption (Jeantet *et al.*, 2007). On a observé qu'en augmentant l'épaisseur de l'emballage, la sorption du limonène augmente avec la masse de l'emballage qui agit à ce moment comme un agent sorbant (Ikegami *et al.*, 1991).

Dans une étude sur le transfert de l'acétate d'éthyle, le butyrate d'éthyle et l'hexanoate d'éthyle à travers du papier traité et des films plastiques, et indépendamment de la nature du composé aromatique, de sa concentration et de la température, le transfert était principalement contrôlé par la microstructure de l'emballage. Une affinité mutuelle entre le composé aromatique et la surface de l'emballage, déterminée expérimentalement ou estimée, est liée à leur hydrophobie respective à la température de 25 °C et pour une humidité relative de 50 % (Dury-Brun *et al.*, 2008a).

Il convient de rappeler que le *Darfiyeh* s'affine dans la peau de chèvre. L'affinage reste un processus complexe, encore mal maîtrisé. La section suivante portera sur les mécanismes de dégradation des constituants lipidiques et protéiques, ainsi que sur l'écologie et la biodiversité de la flore bactérienne d'affinage.

2.5 Affinage des fromages

2.5.1 Introduction

La transformation du lait en fromage fait intervenir deux paramètres principaux dont l'effet stabilisant est complémentaire : un abaissement du pH obtenu par acidification et un abaissement de l'activité de l'eau (a_w) résultant de la concentration de la matière sèche par égouttage, salage et évaporation. Pour assurer une stabilisation complète du substrat, des transformations dirigées par voies enzymatique et microbienne peuvent intervenir, elles constituent la phase d'affinage. Ainsi au cours de ce dernier, plusieurs réactions biochimiques complexes s'effectuent dans la masse du fromage, notamment (1) la glycolyse, (2) la lipolyse et le catabolisme des acides gras et (3) la protéolyse et le catabolisme des acides aminés. Les agents de l'affinage sont : (1) les enzymes naturelles du lait, (2) les enzymes coagulantes et (3) les enzymes des micro-organismes qui peuplent les pâtes (ceux-ci pouvant provenir du lait, des levains, de la saumure, de l'atmosphère des locaux, du matériel de fromagerie, ...).

Le lait n'est pas normalisé, les micro-organismes et les enzymes impliquées dans ses transformations varient en nature et en concentration ; l'affinage est un processus complexe.

Les mécanismes de dégradation des constituants lipidiques et protéiques pendant l'affinage des fromages, ainsi que la microbiologie de ces derniers feront l'objet de la présente section. Le catabolisme des acides gras et celui des acides aminés, ainsi que l'écologie et la biodiversité de la flore bactérienne d'affinage des fromages seront également exposés.

2.5.2 Biochimie de l'affinage

Un aperçu général des réactions biochimiques qui se déroulent pendant l'affinage des fromages est illustré dans la **Figure 8**.

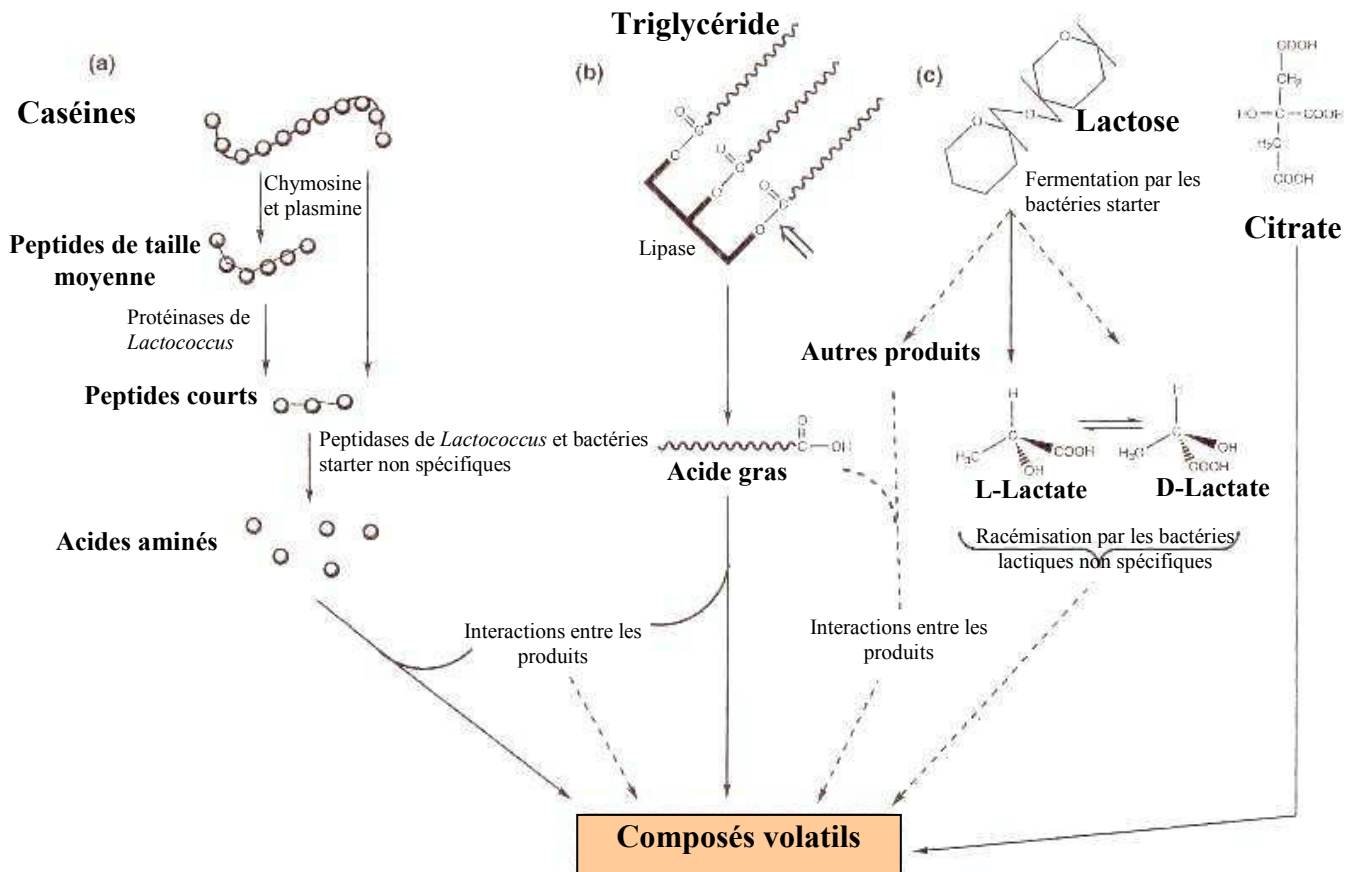


Figure 8. Aperçu général des réactions biochimiques pendant l'affinage des fromages

Source : Fox et al. (2004)

2.5.2.1 La glycolyse

Le lactose fournit de l'acide lactique par fermentation homolactique, mais par fermentation hétérolactique, il donne du CO_2 , de l'éthanol et de l'acide acétique. La fermentation alcoolique par les levures donne du CO_2 , de l'éthanol et de l'acétaldéhyde. A partir de l'acide citrique, les bactéries lactiques produisent de l'acétoïne, du diacétyle et du butanediol. A partir de l'acide lactique, la fermentation propionique donne de l'acide propionique et du CO_2 . L'oxydation par le cycle de Krebs, due aux levures et aux moisissures produit du CO_2 et de l' H_2O . Le **Tableau 7** indique les effets de la glycolyse sur la qualité des fromages.

Tableau 7. Principaux effets de la glycolyse sur la qualité des fromages

Enzymes ou voies métaboliques	Source d'enzymes	Substrat majeur	Molécules produites	Descripteur sensoriel
β - galactosidase	Bactéries lactiques	Lactose	Glucose Galactose Acide lactique (post acidification)	Acide Cœur dur, blanc Texture sèche
Voie homo-fermentaire	Bactéries lactiques	Glucose Galactose	Lactates Acide lactique (post acidification)	Acide Cœur dur, blanc Texture sèche
Voie hétéro-fermentaire	Leuconostocs	Glucose Galactose	Lactates Ethanol Acétate CO ₂ Acide lactique	Fermenté Alcoolisé Acide
Voie du citrate	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> Leuconostocs	Citrate	Acétate Diacétyl Acétoine CO ₂	Fermenté Alcoolisé Noisette Acide
Voie du propionate	<i>Propionibacterium</i>	Lactate	Propionate, acide gras en C3 et acide acétique C2 Acétate	Acide Arôme d' <i>Emmental</i>

Source : Le Mens (2006)

2.5.2.2 La lipolyse et la dégradation des composés lipidiques

La matière grasse laitière est essentielle au développement de la flaveur des fromages. Ceci a pu être démontré quand la matière grasse laitière a été remplacée par d'autres types de matières grasses. Les lipides présents dans les fromages peuvent subir une hydrolyse enzymatique ou une oxydation. Les acides gras polyinsaturés sont sujets à l'oxydation, ce qui favorise la formation d'aldéhydes. L'oxydation des lipides est limitée dans la matrice fromagère, probablement en raison du faible potentiel redox (-250mV) et par la présence d'antioxydants naturels comme la vitamine E (Fox *et al.*, 2000). La lipolyse dans les fromages est due à la présence d'enzymes lipolytiques qui coupent les liaisons esters des triacylglycérols, produisant des acides gras libres, des mono- et des diacylglycérols (Deeth et Touch, 2000). Les acides gras libres sont des précurseurs importants des réactions cataboliques, qui produisent des composés volatils et contribuent à la flaveur des fromages. Cependant, ces réactions cataboliques ne sont pas très bien maîtrisées (McSweeney et Sousa, 2000).

Les enzymes lipolytiques sont classées en estérases ou en lipases. Les sources principales d'enzymes lipolytiques, leurs substrats et les molécules produites sont indiqués dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. Hydrolyse de la matière grasse du lait pendant l'affinage

Enzymes principales ou voies métaboliques	Source principale d'enzymes	Substrat majeur attaqué	Molécules produites
Lipases	Lait Moisissures <i>Pseudomonas</i> <i>Geotrichum</i>	Triacylgcérols	Acides gras Triacylgcérols partiels
Estérases	<i>Pseudomonas</i> Levures Microcoques	Acides gras	Composés fruités Esters, acétate d'éthyle
β -oxydation	<i>P. camemberti</i> <i>P. roqueforti</i>	Acides gras	Méthylcétones Alcools secondaires

Source : Le Mens (2006)

2.5.2.2.1 Les agents de la lipolyse

Le lait, la présure, les bactéries lactiques "levains" et "non levains" et la microflore secondaire sont les sources d'origine des lipases (McSweeney et Sousa, 2000).

2.5.2.2.1.1 A partir du lait

Le lait contient une lipoprotéine lipase (LPL) qui, normalement, n'atteint jamais son activité optimale dans le lait. Cette LPL hydrolyse préférentiellement les triacylgcérols à chaînes de longueur moyenne par rapport aux triacylgglycérols à longues chaînes. Ceci est dû aux propriétés de solubilité et de mobilité des triacylgcérols à chaînes moyennes dans les systèmes émulsionnés qui sont à l'origine d'une hydrolyse rapide (Deckelbaum *et al.*, 1990). Olivecrona *et al.* (1992) ont montré que la LPL est relativement non spécifique pour un type d'acide gras, mais qu'elle est plutôt spécifique pour les positions *sn-1* et *sn-3* des mono, di- et triacylgcérols. Les acides gras à chaînes courtes et moyennes sont préférentiellement libérés par la LPL. Selon Chavarri *et al.* (1998), 73 à 95 % de l'activité de la LPL sont détruits lors de la pasteurisation. L'activité de la LPL diminue également au cours de la période de lactation.

2.5.2.2.1.2 *A partir de la présure*

Les présures commerciales sont normalement exemptes d'activité lipolytique. Cependant, les pâtes de présure préparées à partir des caillettes (abomasums) de jeunes ruminants et utilisées dans la production de quelques variétés de fromages italiens à pâte dure, comme le *Provolone* et le *Romano*, contiennent une lipase, la PGE (estérase pré-gastrique) (Nelson *et al.*, 1977). Certaines lipases fongiques, comme celles sécrétées par *Rhizomucor miehi* pourraient être des alternatives acceptables.

2.5.2.2.1.3 *A partir des enzymes microbiennes lipolytiques*

Pour hydrolyser la matière grasse laitière dans le lait et les fromages, les bactéries lactiques possèdent des enzymes lipolytiques, capables d'hydrolyser une multitude d'esters d'acides gras, des substrats de tri-, di- et monoacylglycérols (Liu *et al.*, 2001).

Les espèces appartenant aux genres *Lactococcus* et *Lactobacillus* sont généralement considérées comme ayant une activité lipolytique faible, en comparaison avec d'autres espèces de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium* (Chich *et al.*, 1997). Cependant, en raison de leur présence, à des taux élevés durant la période d'affinage des fromages, les bactéries lactiques sont considérées comme responsables de la libération de niveaux non négligeables d'acides gras libres. Malgré leur faible activité lipolytique, leurs enzymes contribuent à la lipolyse du fromage *Cheddar* (Collins *et al.*, 2003a).

Jusqu'à présent, les lipases/estérases des bactéries lactiques sont considérées comme exclusivement intracellulaires et quelques unes ont été identifiées et caractérisées (Chich *et al.*, 1997 ; Liu *et al.*, 2001). El Soda *et al.* (1986) ont montré la présence d'enzymes lipolytiques dans quatre souches de lactobacilles : *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* et *Lb. acidophilus*. Tous les lactobacilles ont montré une activité lipolytique contre les substrats jusqu'à C_{5:0}. Des lipases/estérases ont été mises en évidence dans neuf souches de *Lc. lactis* subsp. *lactis* et de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Piatkiewicz, 1987).

Il faut ajouter que les bactéries propioniques sont 10 à 100 fois plus lipolytiques que les bactéries lactiques (Dupuis, 1994).

2.5.2.2.2 *Le catabolisme des acides gras*

Dans les fromages, les acides gras libres produits au cours de la lipolyse, surtout ceux à courte et moyenne longueur de chaîne contribuent directement à la flaveur de certaines variétés de fromages (McSweeney et Sousa, 2000). Ces acides gras libres sont des précurseurs de réactions

cataboliques, conduisant à la formation de composés aromatiques, comme les méthylcétones, les lactones, les esters et les alcools secondaires (**Figure 9**).

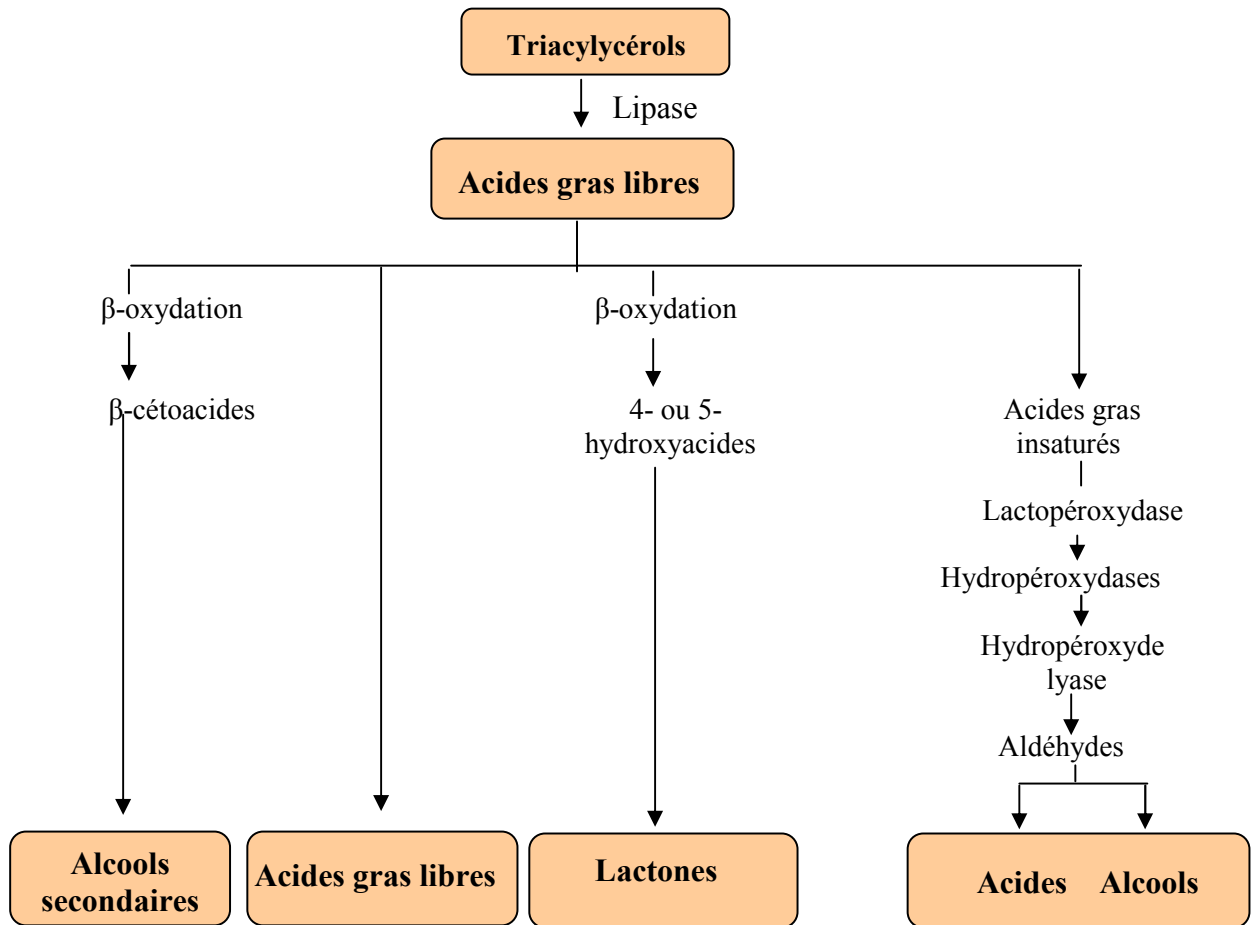


Figure 9. Catabolisme des acides gras libres

Source : Molimard et Spinnler (1996) dans Collins *et al.* (2003b)

Les méthylcétones sont des produits importants résultant des réactions cataboliques des acides gras libres, surtout dans les fromages bleus (persillés). Ils sont formés dans les fromages grâce à l'action des lipases fongiques, comme celles de *Penicillium roqueforti* (Urbach, 1997), *P. camemberti* et *Geotrichum candidum* (Molimard et Spinnler, 1996). On a montré que les acides gras libres ne sont pas les seuls précurseurs des méthylcétones. Ces dernières peuvent aussi être formées par des cultures de moisissures à partir des cétoacides naturellement présents dans la matière grasse laitière ou par oxydation des acides gras monoinsaturés (Kinsella et Hwang, 1976). Le taux de production des méthylcétones dans le fromage est affecté par le pH, la température, l'état physiologique de la moisissure et la concentration en acides gras.

Les esters et les thioesters sont d'autres produits du catabolisme des acides gras, ce sont des composés volatils des fromages (Urbach, 1997). Les esters sont fortement aromatiques et se forment lors de la réaction entre les acides gras libres et les alcools. Les réactions d'estérification se produisent entre les acides gras à courte et moyenne chaînes et les alcools proviennent de l'hydrolyse du lactose ou du catabolisme des acides aminés. Les thioesters sont formés quand les acides gras libres réagissent avec des groupes sulfuriques (Molimard et Spinnler, 1996).

Des alcools secondaires peuvent être formés dans les fromages par réduction enzymatique des méthylcétones. De Llano *et al.* (1992) ont trouvé que le 2-heptanol et le 2-nonanol sont les deux principaux alcools dans les fromages bleus artisanaux.

Les lactones sont des composés cycliques formés par estérification intramoléculaire entre les acides gras hydroxylés.

Les aldéhydes sont formés à partir des acides aminés par transamination. Il a été noté que *Streptococcus thermophilus* et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* possèdent une enzyme, la thréonine aldolase, qui catalyse la conversion directe de la thréonine et la glycine à l'acétaldéhyde (Wilkins *et al.*, 1986). Cependant, certains aldéhydes comme le butanal, l'heptanal et le nonanal pourraient être formés par β -oxydation des acides gras insaturés.

A noter que Mulder (1952) a proposé la théorie de l'*équilibre des composés* qui suppose que la flaveur des fromages est un équilibre entre différents composés aromatiques, qui étant présents à des concentrations bien définies, contribuent à une flaveur typique d'une variété de fromage donné. Cette dernière est très complexe et varie d'une variété de fromages à une autre (Collins *et al.*, 2003). Les acides gras libres sont des acteurs dans la plupart des types de fromages et les méthylcétones sont caractéristiques des fromages bleus affinés (Molimard et Spinnler, 1996). Dans d'autres types de fromages, la contribution exacte d'une classe spécifique de composés aromatiques reste à élucider.

2.5.2.3 La protéolyse et la dégradation des composés protéiques

2.5.2.3.1 Les principales enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques peuvent provenir du lait, de la présure et des micro-organismes d'affinage (**Tableau 9**).

Tableau 9. Hydrolyse des protéines du lait avec apparition de composés aromatiques et modification de la texture

Principales enzymes ou voies métaboliques	Source principale d'enzymes	Substrat majeur attaqué	Molécules produites
Chymosine	Présure	Caséines : β , α S1,	Polypeptides
Pepsine	Présure	Caséines : β , α S1,	Peptides
Plasmine	Lait	Caséines : β , α S2,	Caséine- γ Protéose peptone polypeptides
Protéases Extracellulaires Intracellulaires**	Bactéries lactiques		Polypeptides Peptides
Peptidases Aminopeptidases Dipeptidases Carboxypeptidases***	Bactéries lactiques	Polypeptides Peptides	Acides aminés
Décarboxylases	Microcoques Enterocoques <i>Brevibacterium</i>	Acides aminés	Amines
Désaminases	Lactobacilles <i>Geotrichum candidum</i>	Acides aminés	Aldéhydes Ammoniac Acides organiques
	Bactéries lactiques Microcoques Entérocoques	Acides aminés	Nouveaux acides aminés
Lyases	<i>Brevibacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>P. camemberti</i>	Acides aminés	Phénol Indole Composés soufrés

Source : Le Mens (2006)

** actives après lyse des bactéries

*** sauf chez les lactocoques

2.5.2.3.2 Le catabolisme des acides aminés

Pendant toute la durée de l'affinage, les protéines sont soumises à une intense activité enzymatique. La "protéolyse primaire" qui correspond au "découpage" des caséines en gros peptides, est essentiellement liée à l'action des protéases contenues dans la présure, notamment la chymosine et à celle de la plasmine, la principale protéase native du lait. La "protéolyse secondaire" correspond à l'hydrolyse des gros peptides par l'action des protéinases et des peptidases des bactéries lactiques "levains" et "non levains" donnant des peptides plus courts et des acides aminés (Fox *et al.*, 2004).

La désamination des acides aminés produit du NH_3 et des cétoacides. Le CO_2 et les amines apparaissent lors de la décarboxylation des acides aminés. La dégradation de leurs chaînes latérales conduit à des phénols, de l'indole, du méthanthiol et d'autres composés soufrés. Le NH_3 et des aldéhydes apparaissent suite à la désamination oxydative des amines, les aldéhydes lors de la réduction des cétoacides et des alcools ou des acides par réduction ou par oxydation des aldéhydes. La dégradation des protéines par les protéases et les aminopeptidases conduit à des peptides sapides, amers, sucrés et acides (**Figure 10**).

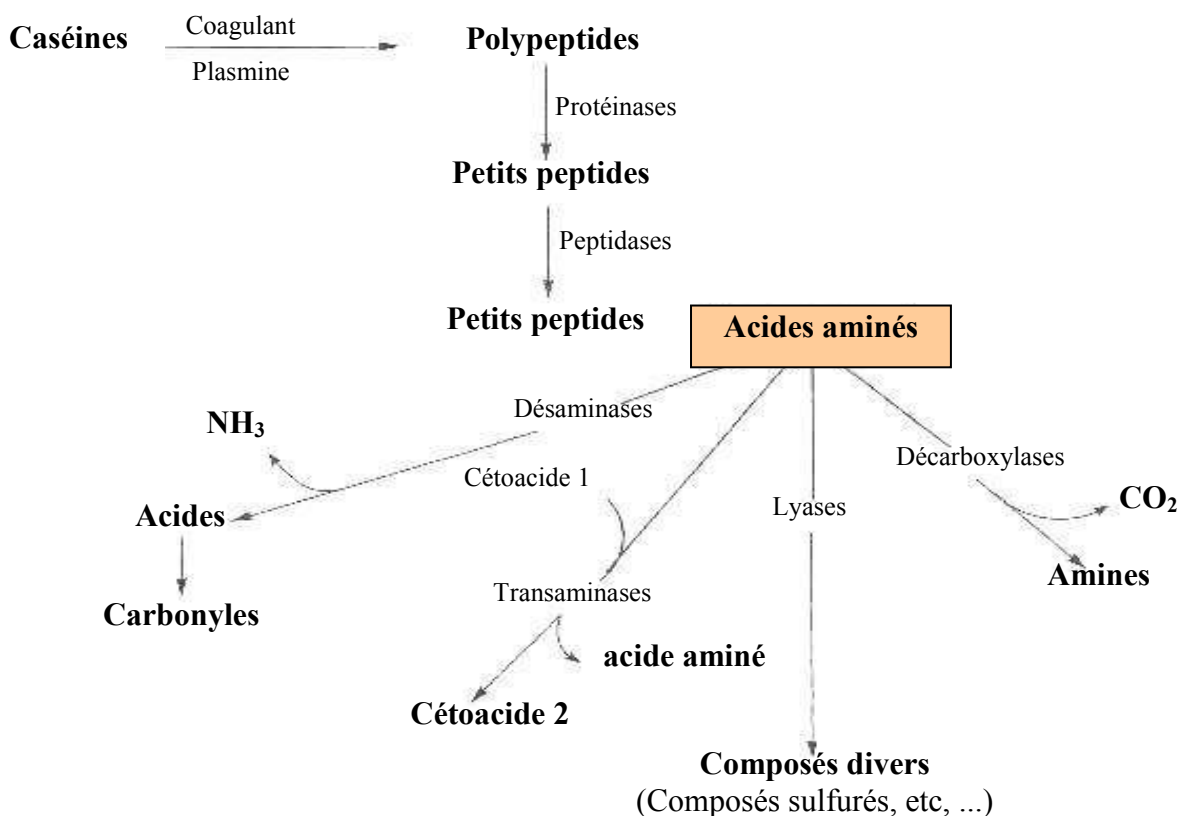


Figure 10. Catabolisme des acides aminés pendant l'affinage des fromages

Source : Fox *et al.* (2004)

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

Les bactéries lactiques "levains" (ajoutées aux fromages pour améliorer la flaveur ou pour accélérer leur affinage) et "non levains" (micro-organismes qui résistent à la pasteurisation du lait ou qui peuplent le lait pasteurisé ou le caillé au cours de la production et dans des conditions propices) ont une activité protéolytique. Elles seront décrites dans la section 2.5.3. destinée à la microbiologie de l'affinage. Les systèmes protéolytiques de *Lactococcus* sp. et des lactobacilles thermophiles ont été étudiés *in extenso* (Fox et McSweeney, 1996 ; Christensen *et al.*, 1999) en raison de leur importance économique dans la production de cultures "levains". Cependant, les systèmes protéolytiques des lactobacilles mésophiles qui dominent la microflore "non levains", lors de l'affinage, n'ont pas fait l'objet d'études aussi fouillées.

La différence dans le taux d'azote soluble est en relation avec le taux d'humidité, la température, le pH et la durée de l'affinage. Elle est principalement due à l'action de la chymosine, ainsi qu'à celle de la plasmine (Fox et McSweeney, 1996).

2.5.3 Microbiologie de l'affinage

2.5.3.1 Introduction

La production de fromages artisanaux, surtout ceux à base de lait cru, est fortement liée au terroir, par le biais de la composition du lait tant dans sa composante biochimique que microbiologique. Cette composante microbienne joue un rôle déterminant sur les qualités sensorielles des fromages. Ainsi, la signature microbienne d'un fromage ne provient pas d'espèces spécifiques mais d'un équilibre entre l'ensemble de souches appartenant à plusieurs espèces et présentes à des niveaux différents. Ainsi, de la diversité microbienne des laits crus et des terroirs naît la diversité des fromages (Michel *et al.*, 2005).

La variété qualitative et quantitative et l'évolution de cette flore au cours des phases de fabrication et d'affinage des fromages à base de lait cru feront l'objet de cette section. Parmi la flore microbienne, les bactéries lactiques "levains" et "non levains" seront les plus analysées.

2.5.3.2 Flore bactérienne associée à l'affinage

Les micro-organismes, englobant les bactéries, les levures et les moisissures, sont présents dans les fromages pendant l'affinage et contribuent à ce processus, soit directement à travers leur activité métabolique, soit indirectement à travers la libération d'enzymes dans la matrice

fromagère. La flore microbienne associée à l'affinage des fromages est extrêmement riche et complexe. Cette communauté pourrait être divisée en deux groupes : les bactéries lactiques "levains" responsables de la production d'acide pendant la fabrication du fromage et la microflore secondaire. *Lactococcus*, *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* et *Lb. helveticus* sont considérés comme des bactéries "levains". La microflore secondaire comporte les quatre groupes suivants : les bactéries lactiques "non levains" (NSLAB, *Non Starter Lactic Acid Bacteria*) appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Leuconostoc*, les bactéries propioniques, les moisissures et les levures et bactéries qui poussent à la surface des fromages (Beresford et Williams, 2004).

2.5.3.3 Bactéries lactiques "levains" et "non levains"

2.5.3.3.1 Les bactéries lactiques "levains"

La fonction principale des bactéries lactiques "levains" est de produire suffisamment d'acide pendant la fabrication du fromage, réduisant ainsi le pH à un niveau désiré (Fox *et al.*, 2004). Elles contribuent aussi à l'affinage grâce à leurs enzymes impliquées dans la protéolyse, la lipolyse et la conversion des acides aminés en composés aromatiques. Cependant, la majorité des enzymes "levains" sont intracellulaires et n'ont pas un accès immédiat à la matrice fromagère. L'aptitude des cellules des levains à mourir et à s'autolyser pendant l'affinage en libérant leur contenu enzymatique est une importante caractéristique pour l'élaboration des fromages. Crow *et al.* (1995) ont montré que les cellules des bactéries autolysées accélèrent la protéolyse alors que les cellules des bactéries intactes assurent la fermentation du lactose. La production de bactériocines par certaines souches de lactocoques induit également une lyse bactérienne pendant l'affinage des fromages, ce qui améliore la flaveur (Morgan *et al.*, 1997). L'autolyse de *S. thermophilus* dans les fromages n'a pas reçu une attention particulière ; cependant, Husson-Kao *et al.* (2000) ont montré que le pH contribue à l'autolyse de cette espèce.

Streptococcus thermophilus a été fréquemment isolé des environnements laitiers, mais récemment des souches de cette espèce ont été isolées de plantes en Bulgarie (Michaylova *et al.*, 2002). Les isolats sont identifiés comme anaérobies, aérotolérants, catalase négative et à Gram positif, incapables de se développer à 10 °C, à un pH de 9,6 ou dans une solution de NaCl à 6,5 % (Sherman, 1937). *Streptococcus thermophilus* est le plus important levain laitier après *Lc. lactis* (Hols *et al.*, 2005). Il est actif contre *Clostridium* sp. (Mathot *et al.*, 2003). L'absence ou l'inactivation des gènes de virulence, liés aux streptocoques pathogènes, a été confirmée chez *S.*

thermophilus (Bolotin *et al.*, 2004), contribuant ainsi à la sécurité dans les produits laitiers fermentés.

Streptococcus macedonicus a été isolé à l'origine dans le fromage grec *Kasseri* et récemment dans des fromages Italiens (Gatto *et al.*, 2002 ; Lombardi *et al.*, 2004).

Des souches de *Lactococcus* sp. ont été utilisées comme levains depuis longtemps dans les produits laitiers fermentés. Seuls *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* sont d'une importance technologique indéniable (Salama *et al.*, 1991). Des souches de *Lactococcus* ont été fréquemment isolées d'une multitude de fromages fabriqués avec des levains ajoutés ou non (Mannu *et al.*, 2000a ; Delgado et Mayo, 2004). *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a été rarement isolé (Urbach *et al.*, 1997).

2.5.3.3.2 Les bactéries lactiques "non levains"

Les bactéries lactiques "non levains" constituent la communauté microbienne globale de la plupart des fromages affinés. Les principaux genres sont des *Lactobacillus*, *Leuconostocs*, *Pediococcus* et *Enterococcus*.

Les lactobacilles "non levains" sont présents dans 19/35 fromages européens artisanaux comme le *Kasseri*, la *Feta*, le *Serra da Estrela*, le *Gredos* et le *Majorero* (Cogan *et al.*, 1997).

Les pédiocoques font partie de la flore "non levains" des fromages siciliens artisanaux (Randazzo *et al.*, 2002), du fromage *Comté* (Bouton *et al.*, 1998) et autres ...

Plusieurs leuconostocs produisent du diacétyl et de l'acétoïne à partir du citrate. Ils ont été isolés de fromages artisanaux à base de lait cru (Hayaloglu *et al.*, 2002) et dans plusieurs fromages produits à partir de lait ovin ou caprin (Pérez *et al.*, 2002).

Les entérocoques sont très répandus dans les produits laitiers et sont considérés comme sécurisants, avec un caractère probiotique (Franz *et al.*, 1999).

Les lactobacilles et les entérocoques seront présentés ci-dessous en détails.

2.5.3.3.2.1 Les Lactobacilles

Les lactobacilles sont des acteurs importants de la flaveur des fromages pendant l'affinage (Beresford *et al.*, 2001). Leur rôle est limité à des propriétés comme la protéolyse et la lipolyse (Chamba et Irlinger, 2004) et plus récemment à un potentiel probiotique (Bernardeau *et al.*, 2008).

Plusieurs espèces de lactobacilles mésophiles ont été isolées des fromages pendant l'affinage ; les plus fréquentes sont *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. curvatus* (Beresford *et al.*, 2001). De nombreuses études ont montré la biodiversité du genre *Lactobacillus* dans les fromages (Ugarte *et al.*, 2006 ; Terzic-Vidojevic *et al.*, 2007). A titre d'exemple, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* subsp. *casei* et *Lb. brevis* ont été isolés du fromage *Armada*, un fromage espagnol à base de lait de chèvre (Herreros *et al.*, 2003), *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. paracasei* subsp. *tolerans*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus* et *Lb. pentosus* du fromage *Batzos*, un fromage traditionnel grec à partir du lait de chèvre cru (Psoni *et al.*, 2003).

Ils peuvent être ajoutés comme levains d'intérêt technologique, et pour la production d'acide à partir du lactose. Ils sont sélectionnés et commercialisés, notamment *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* et *Lb. helveticus* (Bernardeau *et al.*, 2008).

2.5.3.3.2.2 Les Entérocoques

Les entérocoques sont présents dans la plupart des fromages produits au Sud de l'Europe à partir du lait cru ou de lait pasteurisé et sont essentiels au développement des arômes, grâce à leur activité protéolytique et à leur production de diacétyl (Sarantinopoulos *et al.*, 2002). La liste des fromages qui en contiennent ne peut être exhaustive, elle inclut le *Comté* en France (Bouton *et al.*, 1998) et le *semicotto caprino*, un fromage italien artisanal (Suzzi *et al.*, 2000).

Enterococcus faecalis et *E. faecium* sont les espèces les plus fréquemment isolées dans les produits laitiers (Franz *et al.*, 1999) et plus récemment *E. durans* (Suzzi *et al.*, 2000), qui a été probablement mal identifié dans le passé. Le nombre d'entérocoques dans les caillés méditerranéens varient entre 10^4 et 10^6 ufc.g⁻¹, et dans les fromages totalement affinés entre 10^5 et 10^7 ufc.g⁻¹, ceci toujours en fonction de la variété des fromages (Bouton *et al.*, 1998).

Ces micro-organismes peuvent se développer dans un environnement salé, à des valeurs basses de pH (Litopoulo-Tzanetaki *et al.*, 1993). Ils pourraient contaminer le lait, soit directement à partir des fèces des animaux, soit indirectement à partir d'une source d'eau contaminée ou des équipements de traite mal nettoyés (Giraffa *et al.*, 2003).

Certaines souches peuvent être utilisées comme ferments mais d'autres, en particulier *E. faecalis*, peuvent susciter des inquiétudes, étant considérées comme pathogènes opportunistes

par la présence de gènes de virulence et par la résistance de certaines souches aux antibiotiques (Holzapfel, 2003).

Quelques entérocoques d'origine laitière sont capables de produire des bactériocines efficaces contre certaines bactéries pathogènes, comme *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, et quelques espèces des genres *Clostridium* et *Bacillus* (Giraffa *et al.*, 2003).

Le rôle des entérocoques dans les fromages pourra soulever la question de la sécurité alimentaire en raison de leur utilisation dans les aliments comme probiotiques (Franz *et al.*, 2003).

2.5.3.4 Complexité et biodiversité de la flore microbienne

La complexité de la flore microbienne est liée à son importance quantitative et à sa diversité qualitative et surtout à son évolution permanente. Cette évolution peut être la conséquence des variations des conditions du milieu. L'environnement très sélectif conditionne le développement et la survie des micro-organismes pendant la fabrication et l'affinage des fromages. La quantité d'eau et de sel, le pH, la présence d'acides organiques et de nitrates, le potentiel redox et la température de l'affinage sont d'une très grande importance (Beresford *et al.*, 2001).

2.5.3.4.1 Fromages au lait cru contre fromages au lait pasteurisé

La simple comparaison de la flore microbienne des fromages au lait cru et des fromages au lait pasteurisé, fait apparaître une diversité caractéristique des premiers grâce à leur "microflore naturelle très riche", ceci aussi bien au niveau du genre que de l'espèce (Callon *et al.*, 2001 ; Garcia *et al.*, 2002 ; Fortina *et al.*, 2003).

Les souches de lactobacilles qui dominent la flore "non levains" du fromage *Cheddar*, sont plus nombreuses dans le *Cheddar* à base de lait cru que dans celui fabriqué avec du lait pasteurisé (Mc Sweeney *et al.*, 1993). La pasteurisation et la microfiltration du lait diminuent cette diversité.

Les fromages italiens au lait de brebis cru ont des populations plus riches en flore "non levains", surtout en lactobacilles mésophiles. Les bactéries lactiques présentes dans le *Pecorino sardo*, un fromage Italien artisanal à pâte mi-dure, fabriqué à partir de lait cru, sans addition de levains, sont différentes de ceux fabriqués à partir du lait pasteuriséensemencé avec des levains thermophiles (De Angelis *et al.*, 2001).

L'utilisation de lait cru, dans les fabrications artisanales, conduit à la préservation de la microflore sauvage, et par la suite au maintien de la diversité microbienne des bactéries lactiques indigènes des fromages (Mannu *et al.*, 2002).

De nouvelles techniques moléculaires, comme la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et la TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis), fondées sur l'analyse des acides nucléiques, sans culture préalable, sont utilisées depuis peu pour la caractérisation des communautés microbiennes dans les fromages. Coppola *et al.* (2001) ont observé que le profil microbien de la *Mozzarella* artisanale au lait cru, comparé à celui de la *Mozzarella* industrielle, est caractérisé par plusieurs bandes différentes, reflétant ainsi une plus grande diversité.

Le profil microbien du *Camembert* comporte huit bandes d'ADN pour le fromage au lait cru contre cinq pour le *Camembert* au lait pasteurisé (Ogier *et al.*, 2002). L'émergence de la biologie moléculaire, sans culture préalable et la mise en œuvre de différentes techniques ont montré qu'il est possible de différencier et de prouver la typicité des fromages traditionnels, en obtenant une image globale et dynamique des populations bactériennes. El-Baradei *et al.* (2007) ont observé 46 espèces différentes dans le *Domiat*, un fromage Egyptien traditionnel. Licitra *et al.* (2007) ont étudié l'écosystème bactérien du fromage Sicilien *Ragusano* au lait cru.

2.5.3.4.2 Diversité microbienne et richesse sensorielle

La diversité microbienne génère de la diversité et de la richesse sensorielle. Les fromages à base de lait cru s'affinent plus rapidement que ceux à base de lait pasteurisé. En conséquence, les fromages au lait cru développent une odeur/flaveur plus intense au même âge d'affinage par comparaison avec des fromages au lait pasteurisé ou soumis à une microfiltration. Ceci a été observé dans différents types de fromages, comme le *Manchego* (Gomez-Ruiz *et al.*, 2002), dans d'autres fromages à pâte dure ou mi-dure (Buchin *et al.*, 1998 ; Skie et Ardo, 2000) et dans des fromages de chèvre (Morgan *et al.*, 2001). Dans tous les cas, ce phénomène est corrélé directement à l'activité de la microflore indigène du lait.

Des travaux de plus en plus nombreux montrent que les fromages au lait cru ont en général des saveurs plus marquées et plus typiques, par la formation de composés volatils. Cependant, il est difficile d'établir précisément le rôle de cette microflore. Ce rôle pourrait être direct, en transformant les constituants du lait en composés volatils, ou indirect, en modifiant la composition du fromage, avec la production des précurseurs de ces composés volatils ou la production de molécules qui influencent les réactions chimiques ou l'activité des micro-organismes. En particulier, les activités des populations indigènes interfèrent avec les bactéries

"levains". Il est difficile d'établir une identification au niveau genre et au niveau espèce de la population bactérienne. Il est cependant clair que la plupart des voies métaboliques conduisant à la formation des composés volatils sont dépendantes des micro-organismes présents (Yvon et Rijnen, 2001).

Il convient de signaler également qu'un lait cru "propre" suscite le risque d'éliminer les différences sensorielles entre les fromages au lait cru et ceux à base de lait pasteurisé. En comparant la diversité sensorielle entre le *Cheddar* pasteurisé et celui à base de lait cru, des résultats presque similaires sont obtenus en ce qui concerne les lactobacilles mésophiles (Dasen *et al.*, 2003). En conclusion, améliorer les conditions hygiéniques dans les fermes aboutit à un lait cru "propre" avec des populations bactériennes basses. Il existe un lien entre les pratiques de manipulation et de production du lait et sa qualité bactériologique (Michel *et al.*, 2001). Les communautés microbiennes jouent un rôle dans la sécurité microbiologique des fromages au lait cru. Ce rôle potentiel est observé dans plusieurs études sur les laits ou les fromages où la diversité microbienne serait un atout pour faire barrière aux pathogènes comme *Listeria monocytogenes* et *L. innocua* dans certains fromages (Eppert *et al.*, 1997 ; Maoz *et al.*, 2003).

Sans être totalement démontré, plusieurs études sembleraient indiquer que les laits crus pourraient avoir un effet bénéfique sur la santé en améliorant les défenses immunitaires (Moreau et Vuitton, 2002).

Les développements futurs seront de sauvegarder et de maintenir la biodiversité des fromages artisanaux.

3. Matériels et méthodes

3. Matériels et méthodes

3.1 Le *Darfiyeh*

Cette partie expérimentale a pour objectif principal la valorisation durable des laits de chèvre de la région du Nord Liban par leur transformation en fromage *Darfiyeh* et par l'établissement de ses caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques, en vue de la création d'une appellation d'origine, pour tenter de sauvegarder ces fromages en voie de disparition.

3.1.1 Technologie artisanale

3.1.1.1 Préparation de la peau de chèvre "*Dariff*": enceinte d'affinage

La préparation du *Dariff* comprend une série d'opérations délicates effectuées le plus souvent par l'éleveur lui-même. Les différentes étapes de préparation de la peau sont illustrées dans l'**annexe 1**. Cette technique s'apparente à la fabrication ancestrale des outres en peau de chèvre.

La chèvre destinée à l'abattage est choisie en fonction de son âge et de son état de santé vis-à-vis du troupeau. Après l'abattage, la carcasse est fixée par l'une de ses pattes, puis la peau est délicatement prélevée en évitant toute déchirure. Ce *Dariff*, conservé dans un milieu frais, subit un nettoyage et un salage interne (2,0-2,5 kg de NaCl) pendant 10 jours. Le sel est éliminé en grattant l'intérieur de la peau au moyen d'un couteau en prenant soin de ne pas la percer. Les pattes sont nouées et laissent une ouverture au niveau du cou uniquement. Pour s'assurer de son étanchéité, le *Dariff* est gonflé. Une tonte de la peau est effectuée, surtout au niveau du cou et se poursuit par un salage interne de deux jours. La peau de chèvre ainsi préparée devient alors une excellente enceinte d'affinage du *Darfiyeh*.

3.1.1.2 Fabrication des fromages

Il existe différentes méthodes de fabrication du *Darfiyeh* qui varient d'une région à l'autre (Hosri et El Khoury, 2004). Cependant certaines opérations sont communes à tous les producteurs. Le diagramme de fabrication ci-dessous a servi pour la fabrication de nos échantillons de *Darfiyeh* (**Figure 11**).

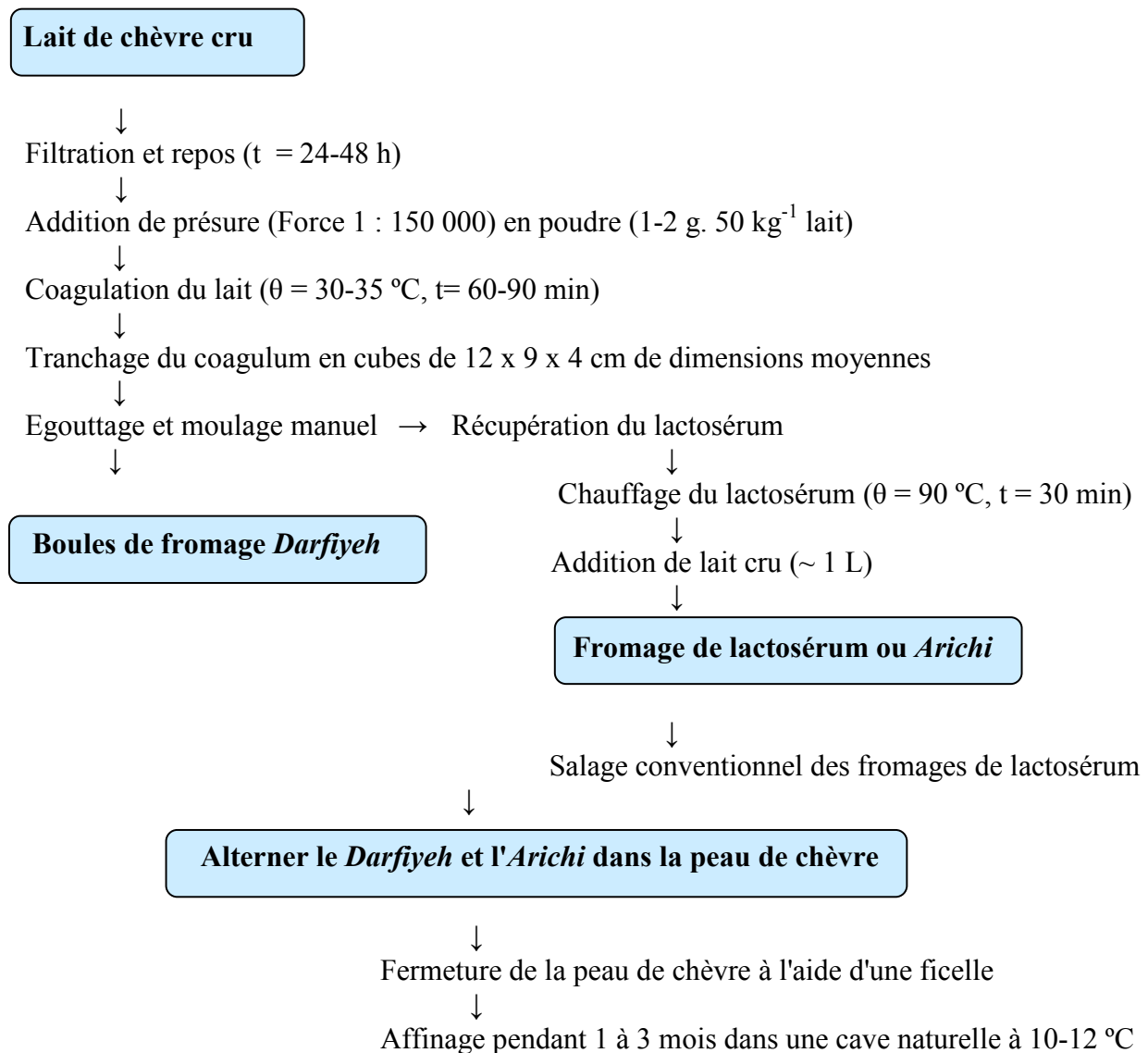


Figure 11. Diagramme de fabrication du Darfiyeh

Le *Darfiyeh* est fabriqué à partir de lait cru de chèvre issu de deux traites. Le lait de la veille est mélangé au lait de la traite matinale. Ce mélange est d'abord filtré afin d'éliminer les impuretés grossières éventuellement présentes. Quelle que soit la saison, le lait est abandonné à lui-même à la température ambiante pendant 24-48 h afin de permettre la croissance de la flore lactique naturelle. Le processus de récupération de la matière sèche du lait se déroule alors en deux étapes. En premier lieu la coagulation du lait aboutit à un caillé égoutté. La deuxième étape consiste à récupérer les protéines du lactosérum par thermocoagulation. Les deux produits sont ensuite incorporés dans la peau de chèvre.

Le lait est chauffé et maintenu à 35 °C, puis emprésuré. L'emprésurage traditionnel est effectué au moyen d'un extrait de caillette de chevreau. Nous avons utilisé ici la Marzyme 150[®], une présure d'origine fongique tirée de *Mucor miehei* (Danisco, France). Cette enzyme (force 1: 150

000) est utilisée à raison de 1,5 g pour 50 kg de lait pour une coagulation obtenue en 60-90 min. Le lait n'est pasensemencé avec des ferments complémentaires et on n'y ajoute pas de chlorure de calcium.

Après coagulation du lait, le caillé est tranché en cubes plus ou moins grands de dimensions variables (12 x 9 x 4 cm en moyenne), afin d'augmenter la surface d'exsudation du lactosérum. Le coagulum, moulé à la louche, s'égoutte dans des faisselles. Les boules de fromage obtenues ont un poids moyen variant entre 400 et 500 g. Les différentes étapes de la fabrication du *Darfiyeh* sont illustrées dans l'**annexe 2**.

D'autre part, le lactosérum additionné de lait cru (30v/1v), est chauffé à 90 °C pendant 30 min dans le but d'en extraire les albumines floculées ou *Arichi* (**Annexe 3**).

Pour le salage, la méthode la plus couramment utilisée en fabrication artisanale du *Darfiyeh* est le salage "à sec". Cette étape consiste à saler les fromages de lactosérum ou *Arichi* en les saupoudrant en surface de sel fin et sec avec une louche. Les fromages frais de *Darfiyeh*, obtenus par coagulation mixte, ne sont pas salés. C'est par diffusion du sel du fromage de lactosérum vers les fromages frais pendant l'affinage qui confèrera le goût salé au fromage final de *Darfiyeh*.

3.1.1.3 Conditions d'affinage

Les boules de *Darfiyeh* sont introduites dans la peau de chèvre, par le cou, en alternant une couche de fromage *Darfiyeh* avec une couche d'*Arichi*. Le *Dariff* est fermé aussi hermétiquement que possible à l'aide d'une ficelle sur toutes ses ouvertures (**Annexe 4**). La peau de chèvre remplie doit prendre l'aspect d'une outre gonflée. Salé de l'extérieur, ce *Dariff* est placé dans une grotte naturelle humide pendant une durée d'affinage de 1 à 3 mois. Tout au long de cette période de maturation, durant laquelle un salage périodique est effectué, le positionnement de "l'outre" est changé périodiquement.

La grotte destinée à la maturation du *Darfiyeh* présente l'avantage d'être naturellement conditionnée grâce à l'épaisseur des parois et à l'absence d'ouvertures. Les conditions d'ambiance que doit remplir cette grotte concernent notamment la température qui doit se situer entre 10-12 °C et l'hygrométrie, avec une humidité relative de l'ordre de 85 à 95 % (HI9065, Thermo Hygrometer, Hanna Instruments).

3.1.2 Echantillonnage

3.1.2.1 Conditions et fréquences de prélèvement

Pour les besoins de notre étude et dans les conditions de prise des échantillons, le lien fixé au niveau cou du *Dariff* est défait et une sélection arbitraire de l'échantillon de fromage est effectuée. A chaque prélèvement, le *Dariff* est resserré et refermé hermétiquement au moyen du même lien, de manière à éviter toute entrée d'air.

L'échantillonnage a été réalisé sur trois lots de productions distinctes de *Darfiyeh* (A, B et C), réalisées à 20 jours d'intervalle. Trois prélèvements par production ont été effectués au cours de l'affinage après 20, 40 et 60 jours.

3.1.2.2 Conditions de stockage et de transport

Depuis le site de production à Btellaiye, dans la région montagneuse nord-libanaise, vers le laboratoire d'analyses à l'Université Saint-Esprit de Kaslik à Jounieh (Liban), les échantillons de fromage ont été transportés en sacs isothermes, maintenus approximativement à + 4 °C au moyen de plaques réfrigérantes congelées. Les échantillons sont ensuite congelés à – 20 °C pendant 2-3 mois au cours de la période d'analyses effectuées au Liban. De nouveau, les échantillons sont maintenus approximativement à + 4 °C afin de maintenir des conditions de stockage appropriées, en vue de leur transport vers les laboratoires d'analyses à Nancy, France.

3.2 Caractérisation physico-chimique

3.2.1 Lait destinés à la fabrication fromagère

Des échantillons de lait destinés à la fabrication des trois lots de production du *Darfiyeh* ont été collectés et les paramètres physico-chimiques classiques (matière grasse, densité, conductivité, extrait sec dégraissé, protéines, lactose, pH, minéraux) ont été déterminés à l'aide du Lactoscan S[®] (Bulgarie). Les mesures ont été faites en triple.

3.2.2 Matière grasse du lait

3.2.2.1 Extraction par la méthode de Röse-Gottlieb

La méthode utilisée est celle de Röse-Gottlieb. A cet effet, 1 mL d'ammoniaque concentré est ajouté à 10 mL de lait dans une ampoule à décanter graduée, spécialement dédiée, le butyromètre de Pien. Après agitation pendant une minute, on ajoute 10 mL d'alcool éthylique à 95°. Après agitation supplémentaire d'une minute par balancement lent en amenant le lait dans la panse centrale, on complète par l'ajout de 25 mL d'éther diéthylique. Sous agitation, tout en ayant soin de dégazer car la pression augmente fortement, 25 mL d'éther de pétrole sont ajoutés. L'appareil est abandonné sur un support en position verticale pendant 2 h environ. La séparation des phases aqueuses et éthérées se produit alors et la phase éthérée est récupérée. L'extraction est répétée et les phases éthérées sont rassemblées dans un ballon taré. Les solvants sont éliminés à 50 °C à l'évaporateur rotatif sous vide. Le résidu pesé correspond à la matière grasse de 10 mL de lait.

3.2.2.2 Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse

Les esters méthyliques d'acides gras ont été préparés par le réactif au trifluorure de bore à la concentration de 8 % dans le méthanol (BF₃/MetOH).

Une masse de 100 mg d'échantillon est pesée dans un tube à essai à vis de 10 mL. Un volume de 1,5 mL d'hexane et 1,5 mL de BF₃/MetOH sont ajoutés. Le tube est fermé hermétiquement sous azote, agité énergétiquement pendant 1 min, puis chauffé à 100 °C pendant 1 h. Après refroidissement à température ambiante, on ajoute 1 mL d'hexane et 2 mL d'eau distillée, puis une agitation sous azote est effectuée. Deux phases se séparent après repos. La phase supérieure est récupérée dans un autre tube mis sous azote. La phase inférieure est extraite deux fois avec 1 mL d'hexane. L'ensemble des phases contenant les esters méthyliques est lavé avec 2 mL d'eau distillée, puis séché sur sulfate de sodium anhydre. Le solvant est évaporé sous azote. De l'hexane est ajouté pour adapter la concentration des esters méthyliques à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

L'analyse des esters méthyliques est réalisée dans un chromatographe Péri-2000 (Périchrom, Saulx-lès-Chartreux, France) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Les esters sont séparés sur une colonne capillaire (Varian, FAME™ # CP 7419, longueur : 50 m, diamètre : 0,25 mm, épaisseur du film : 0,25 µm). Les températures du détecteur et de l'injecteur sont fixées à 260 °C. Le programme utilisé pour l'analyse est : 1 min à 120 °C, puis la colonne est portée à 220

°C (3 °C.min⁻¹) et maintenue durant 20 min à cette température. Le refroidissement s'effectue à raison de 39,9 °C.min⁻¹. L'identification des pics est réalisée à l'aide de standards d'acides gras de la matière grasse laitière anhydre (MGLA) fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France). Le logiciel Winlab 3 (Périchrom, Saulx-lès-Chartreux, France) permet l'intégration des chromatogrammes.

3.2.3 Fromages *Darfiyeh*

3.2.3.1 Mesure du pH

Des prélèvements de *Darfiyeh* (environ 10 g) sont malaxés pour obtenir une pâte homogène. Les mesures du pH sont réalisées avec un pH-mètre 210 Microprocessor (Hanna Instruments, France).

3.2.3.2 Dosage du taux d'humidité

Entre 3 et 5 g de fromage, exactement pesés, sont broyés dans un cristallisateur contenant du sable de Fontainebleau (préalablement desséché à l'étuve et refroidi dans un dessiccateur, puis taré avec le sable sans perte) jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Les échantillons sont portés dans une étuve à 103 °C pendant 5 h. L'humidité totale est définie selon la formule suivante:

$$\text{Taux d'humidité} = \frac{\text{masse de l'échantillon frais} - \text{masse de l'échantillon sec}}{\text{masse de l'échantillon frais}} \times 100$$

3.2.3.3 Dosage du taux de matière grasse par la méthode de Van Gulick

La méthode de Van Gulick est une extension de la méthode acido-butyrométrique appliquée au lait. Environ 3 g de fromage sont exactement pesés dans un godet adapté au butyromètre. Le godet est recouvert à ras avec de l'acide sulfurique pour l'analyse du fromage (d = 1,530), obtenu en mélangeant v/v H₂SO₄ d = 1,830/eau. Les butyromètres sont placés en bain d'eau à 75 °C, sous agitation pour aider à la dissolution du fromage. Quand l'attaque est terminée, on ajoute 1 mL d'alcool iso-amylque (3-méthyl, 1-butanol) et l'on complète avec H₂SO₄ jusqu'aux 4/5ème de la tige. Après agitation, une centrifugation de 5 min est appliquée. La lecture est faite après passage de quelques minutes au bain d'eau à 65 °C. Les butyromètres sont étalonnés en pourcentage pour un poids exact de 3 g. Si le poids est différent de 3 g, il est nécessaire de procéder à une interpolation.

$$\text{Teneur exacte en matière grasse (\%)} = \frac{\text{lecture de matière grasse (\%)} \times 3}{\text{masse de l'échantillon}}$$

3.2.3.4 Dosage du taux des matières azotées

La détermination de la matière azotée est effectuée selon la méthode de Kjeldahl (AOAC, 1997). Cette méthode de référence est fondée sur la transformation de l'azote organique en azote minéral sous forme ammoniacale $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par l'action oxydative de l'acide sulfurique bouillant sur la matière organique en présence d'un catalyseur de minéralisation (Na_2SO_4 17g/100g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,5g/100g).

Les échantillons sont introduits dans des matras (tubes de minéralisation), puis minéralisés sur une rampe (Kjeldatherm, Gerhardt, Les Essarts le Roi, France) à 420 °C pendant 3 h. Le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est le produit essentiel de la minéralisation, obtenu par l'ajout d'acide sulfurique (H_2SO_4). Une base forte (NaOH) est ajoutée en volume égal au volume d' H_2SO_4 introduit à l'aide d'un système de type microanalyse (Vapodest 50, Gerhardt, Les Essarts-le-Roi, France) selon la réaction suivante :



Au cours de la distillation, l'hydroxyde d'ammonium formé (NH_4OH) est entraîné par la vapeur d'eau et récupéré dans un vase de titrage contenant une solution d'acide borique en excès. Le borate d'ammonium formé $(\text{NH}_4)_3\text{BO}_3$ fait augmenter le pH de la solution. La solution est ensuite titrée par de l'acide sulfurique titré. Le volume d'acide sulfurique ajouté correspond à l'ammonium contenu dans l'échantillon du départ. Le dosage est réalisé de façon automatique avec un appareil de type Vapodest 50 Gerhardt. Pour chaque échantillon, l'analyse est répétée trois fois.

Les résultats sont exprimés en g pour 100 g de fromage selon les formules suivantes et les résultats finaux sont exprimés en pourcentage d'azote total (% NT).

$$NT = \frac{(V_1 - V_0) \times 0,14 \times 10}{P} ; \quad ANC = \frac{(V_1 - V_0) \times 0,14 \times 50}{8 \times P} ; \quad ANP = \frac{(V_1 - V_0) \times 0,14 \times 10}{P}$$

$$\text{Taux protéines (g/100 g fromage)} = 6,38 \times NT$$

Avec V_1 : volume d' H_2SO_4 nécessaire au titrage de l'échantillon en mL ;
 V_0 : volume d' H_2SO_4 nécessaire au titrage du blanc en mL ;
 P : masse de l'échantillon du fromage en g ;
 6,38 : facteur protéique (Adler-Nissen, 1986).

3.2.3.5 Dosage du taux de chlorures

La teneur en chlorure de sodium est déterminée par une méthode potentiométrique au moyen d'un chloruromètre (Subra-S100, Grosseron, St-Herblain, France). A environ exactement 10 g de fromage, exactement pesés, sont ajoutés 90 mL d'eau distillée. L'ensemble est homogénéisé dans un mortier. L'appareil est mis en marche 20 minutes avant la mesure. Le commutateur est positionné sur 100 μ L. Un volume de 15 mL de solution "pour chloruromètre", selon la formule du fabricant, sont introduits dans un bécher. Après avoir mis le bécher en place, le bouton "C" (conditionnement) est actionné, afin d'éliminer les traces de NaCl dans la solution. Une valeur fixe est affichée. Un volume d'un mL de solution à 1 g. L^{-1} de NaCl est ajouté et le bouton "T" (titration) est actionné. Dans le récipient contenant encore la solution d'étalonnage, 1 mL de la suspension aqueuse de fromage est introduit, suivi d'une titration. Les résultats sont exprimés en g NaCl . kg^{-1} de fromage.

3.3 Fractions lipidiques du *Darfiyeh*

3.3.1 Lyophilisation des fromages

Les échantillons de fromages ont été congelés dans des ballons 12 h avant d'être lyophilisés dans l'appareil Christ[®], alpha 1-2 LD pendant 48 h à une pression < 0,1 mbar, à - 60 °C. Les lyophilisats obtenus ont été conservés dans des dessiccateurs jusqu' à leur utilisation.

3.3.2 Extraction des lipides

Les lipides totaux ont été extraits selon les méthodes Soxhlet (AOAC, 1997) et Folch *et al.* (1957), comme décrites ci-dessous. L'huile extraite selon la méthode de Soxhlet a servi pour les analyses de chromatographie en phase gazeuse, alors que l'huile extraite selon la méthode de Folch *et al.* a servi pour la séparation des classes de lipides par Iatroscan[®].

3.3.2.1 La méthode de Soxhlet

L'huile est extraite d'échantillons de 100 g de fromages à l'éther de pétrole selon la méthode de Soxhlet pendant 6 h. La teneur en huile est déterminée par gravimétrie après évaporation du solvant à 50 °C.

3.3.2.2 La méthode de Folch *et al.* (1957)

L'extraction de l'huile a également été réalisée selon la méthode de Folch *et al.* (1957). Cette dernière méthode se fonde sur l'utilisation de solvants organiques pour extraire la totalité des lipides polaires et apolaires. A un échantillon de 50 g de fromage, 200 mL de chloroforme et 100 mL de méthanol sont ajoutés puis homogénéisés vigoureusement à l'aide d'un mixeur pendant 2 min. Le mélange est filtré sur Büchner muni d'un papier filtre Whatman n°1. Le résidu est redispersé dans un mélange chloroforme-méthanol (2/1, v/v, 300 mL), homogénéisé pendant 3 min et filtré à nouveau. Les solides restants sont lavés avec un mélange chloroforme-méthanol (2:1, v/v, 60 mL). Tous les filtrats sont rassemblés dans une ampoule à décanter. Les filtrats sont ajoutés à 0,2 volume d'une solution de NaCl à 0,7 %. On observe une séparation en deux phases : une phase surnageante contenant les composés non lipidiques et une phase organique contenant la quasi-totalité des lipides. La phase organique est récupérée dans un ballon taré, puis le solvant est éliminé à 50 °C à l'évaporateur rotatif sous vide. La teneur en matière grasse est déterminée par gravimétrie.

3.3.3 Analyse des lipides

3.3.3.1 Indice d'acide

L'indice d'acide correspond au nombre de milligrammes de KOH nécessaires pour neutraliser l'acidité libre d'un gramme de matière grasse (AOAC, 1997). Il donne une évaluation de la quantité en acides gras libres. Environ exactement 500 mg de matière grasse sont dissous dans un mélange éthanol/éther diéthylique (1/1, v/v) préalablement neutralisé par l'hydroxyde de potassium 0,1 N en présence de phénophtaléine. On ajoute 4 à 5 gouttes de phénophtaléine au mélange, puis on titre sous agitation magnétique avec une solution d'hydroxyde de potassium 0,1 N jusqu'à coloration rose. L'indice d'acide se détermine comme suit :

$$IA \text{ (mg KOH. g}^{-1} \text{ de matière grasse)} = V \times N \times 56,1 / \text{Masse de la matière grasse}$$

Où V est le volume de KOH nécessaire à la neutralisation des acides gras libres ;

N est la normalité de la solution de KOH ;

56,1 est la masse molaire de KOH.

Dans l'industrie des huiles et corps gras, l'acidité est couramment exprimée en pourcentage d'acide oléique (masse molaire: 282). Cette expression toutefois est superflue en chimie du lait où l'on peut se contenter de la simple correspondance entre la quantité de KOH et la masse de matière grasse.

3.3.3.2 Chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Iatroscan[®])

3.3.3.2.1 Principe de l'appareil

L'analyse des classes de lipides des échantillons de fromage a été réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) couplée à un détecteur à ionisation de flamme Iatroscan[®] (Iatroscan Laboratory Inc, Tokyo, Japan). Les composés organiques sont séparés sur CCM et détectés par un système à ionisation de flamme hydrogène/air (FID Ammeter). La couche d'absorbant (silice) est déposée sur des baguettes de quartz désignées sous le terme de "chromarods" (chromarods[®]-SIII) avant d'être analysés par le logiciel de traitement de données (ChromstarTM).

3.3.3.2.2 Etalonnage des Chromarods-SIII par des molécules standard

Les molécules standard utilisées pour identifier les composés des échantillons lipidiques ont été fournies par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France) :

- Lipides neutres: 2-monopalmitoyl glycérol (99 g/100 g), 1,3-distéaroyl, 2-oléoyl glycérol (99 g/100 g), C8 :0 (99 g/100 g), cholestérol (99 g/100 g).
- Phospholipides: phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidyl-L-sérine (PS), phosphatidylinositol (PI), lyso-phosphatidylcholine (Lyso- PC), sphingomyéline (S).

Les lipides standard sont dissous à raison de 5 mg.mL⁻¹ de chloroforme et la migration est réalisée selon la description au paragraphe 3.3.3.2.3. Les lipides neutres sont séparés dans un éluant apolaire (hexane/diéthyléther/acide formique, 80/20/0,2, v/v/v). Les lipides polaires sont développés dans le mélange de solvants chloroforme/méthanol/eau/ammoniaque 25 % (47/20/2,5/ 0,28, v/v/v/v).

3.3.3.2.3 Séparation des classes des lipides

Avant toute opération, les chromarods doivent être nettoyés au niveau de l'analyseur en utilisant la fonction "blank scan" qui permet éliminer les impuretés par brûlage total. Les échantillons destinés à l'analyse sont dissous à raison de 5 mg.mL⁻¹ de chloroforme et déposés sur les "chromarods" ou "rods" à raison de 1 à 5 µL à l'aide d'une micropipette de 1 µL (HirschmannTM Laborgeräte, Germany).

Une première migration est réalisée dans un mélange hexane/diéthylether/acide formique (80/20/0,2, v/v/v) pendant 30 à 45 min afin de séparer les deux principales classes de lipides, les lipides neutres (mono-, di- et triacylglycérols, acides gras libres) qui migrent, alors que les lipides polaires restent fixés à l'emplacement du dépôt. Les chromarods sont ensuite séchés dans une étuve (Rod Dryer TK-B, Tokyo, Japan) à 100 °C pendant 1 min. Un brûlage total ("normal scan") de quelques chromarods permet de détecter et de positionner les lipides neutres et les lipides polaires. Connaissant ce positionnement, le brûlage partiel ("PPS scan") effectué sur les rods restants permet d'éliminer les lipides neutres. Dans ce cas, une deuxième séparation dans un éluant constitué de chloroforme/méthanol/eau/solution d'ammoniaque 25 %, (47/20/2,5/0,28, v/v/v/v), sépare individuellement les lipides polaires, constitués essentiellement de phospholipides. Les chromatographies sont réalisées à 20 °C. L'analyse est conduite sous un flux d'air (200 mL.min⁻¹) et d'hydrogène (160 mL.min⁻¹) ; la vitesse de brûlage est de 30 s par chromarod.

3.3.3.3 Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse

La composition des acides gras par chromatographie en phase gazeuse a été réalisée selon la description au paragraphe 3.2.1.3.3. L'acide nonanoïque C_{9:0} a été utilisé comme étalon interne.

3.4 Analyse des composés volatils par SPME

Les composés volatils résultant de l'affinage des fromages ont été extraits par micro extraction sur phase solide (SPME) et analysés par chromatographie en phase gazeuse à espace de tête. La SPME est une technique rapide développée par Arthur et Pawliszyn (1990) qui permet d'extraire et de concentrer les composés volatils, présents dans un échantillon, en utilisant une fibre en silice, enduite sur l'extérieur avec la phase stationnaire appropriée. La SPME n'impose pas de traitement préalable de l'échantillon. Elle se déroule en deux étapes : la première permet

l'adsorption des analytes dans la fibre et la seconde leur désorption dans un instrument analytique (Pico *et al.*, 2000).

3.4.1 Extraction par SPME

Les échantillons (3 g) ont été prélevés dans la partie interne du fromage, afin de minimiser les composés volatils qui pourraient éventuellement migrer depuis l'environnement vers le fromage. Ils sont mis en équilibre pendant 24 h à 4 °C avant l'analyse dans un flacon en verre "pour espace de tête" d'une capacité 12 mL, fermé par une capsule en aluminium avec septum en silicone - PTFE (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

La première étape de l'extraction consiste en un équilibre de partage entre la phase solide de la fibre et l'échantillon. Cette phase solide est constituée d'un film de divinylbenzène/carboxen/polydiméthylsiloxane (longueur 2 cm, épaisseur 50/30 µm) enrobant la fibre en verre de silice (Supelco, Bellefonte, PA, Etats-Unis). L'ensemble est protégé dans une aiguille creuse amovible. L'aiguille amovible a pour rôle de percer le septum du flacon contenant l'échantillon à analyser. La fibre est alors déployée hors de l'aiguille et maintenue au-dessus de l'échantillon (espace de tête). Les flacons sont chauffés à 60 °C pendant 1 h afin de permettre aux composés volatils de se fixer et de se concentrer sur la phase solide de la fibre.

3.4.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse - espace de tête

La seconde étape de l'analyse consiste en la désorption thermique des composés volatils adsorbés et leur analyse par chromatographie en phase gazeuse à espace de tête.

L'analyse est effectuée grâce à un chromatographe à espace de tête Perkin-Elmer 8500 Gas équipé d'une colonne capillaire SupelcowaxTM (Supelco, Bellefonte, PA, USA) (longueur : 60 m, diamètre interne : 0,32 mm, épaisseur du film : 1 µm) et d'un détecteur à ionisation de flamme. La désorption thermique, d'une durée de 2 min, est réalisée en introduisant la fibre de silice dans l'injecteur du chromatographe chauffé à 250 °C. La température initiale de la colonne est maintenue 1 min à 45 °C, suivie d'une augmentation de température de 45 à 240 °C à raison de 5 °C.min⁻¹, maintenue 12 min à 240 °C, selon Mallia *et al.* (2005).

Les composés élués sont identifiés par comparaison avec des standard (2-butanone, 2-propanol, 3-méthyl butanal, 2,3-butanedione, 2-pentanone, 2-butanol, 1-propanol, 2-pentanol, 1-butanol, 3-méthyl butanol, 2-heptanone, 2-octanone, 2-heptanol, octanal, 1-hexanol, 2-nonanone, 1-octanol, 2-undecanone, 1-phényl éthanol) fournis par Sigma Aldrich (France).

3.5 Caractérisation microbiologique

Les numérations bactériennes classiques et les identifications par PCR ont été effectuées sur les trois lots A, B et C. Il convient de signaler que l'identification et la caractérisation des isolats de bactéries lactiques était effectuée, tout au début de notre travail de recherche, sur un lot unique de *Darfiyeh*, fabriqué chez le même producteur des trois lots A, B et C ; l'identification et la caractérisation des isolats de bactéries lactiques issus de ces derniers lots n'a pas été réalisée.

3.5.1 Numérations bactériennes classiques

Le **Tableau 10** décrit les différents milieux de culture utilisés correspondant aux groupes bactériens recherchés.

Tableau 10. Milieux de culture utilisés et conditions d'incubation

Groupe bactérien	Milieu de culture*	Conditions d'incubation	
		Température (°C)	Temps (h)
Flore aérobie mésophile	PCA	30	72
Microcoques	MSA	37	48
Coques thermophiles	M-17 agar	42	48
Lactobacilles mésophiles	MRS agar	30	96
Lactobacilles thermophiles	MRS agar	42	48

*Les milieux de culture ont été commercialisés par Himedia, Mumbai, India

3.5.2 Recherche, isolement et caractérisation des bactéries lactiques issues du *Darfiyeh*

Afin d'améliorer la recherche des bactéries lactiques, une étape d'enrichissement permettant d'accroître les populations bactériennes a été mise en place. Deux milieux, MRS avec cloche de Durham et Elliker, ont été ensemencés.

A cet effet, une masse de 10 g du fromage *Darfiyeh* est mise en suspension dans 90 mL de tampon citrate afin de réaliser une suspension mère (dilution +1) de fromage. Une série de dilutions décimales en TS est effectuée jusqu'à la dilution 10^{-9} . Un millilitre de chaque dilution décimale de l'échantillon est ensuite introduit dans deux bouillons d'Elliker et dans deux bouillons MRS contenant chacun une cloche de Durham. La première série de cultures en

bouillons d'Elliker et de MRS est incubée à 30 °C et la seconde série à 45 °C, pendant 24 à 48 h. Après l'observation d'un culot ou l'obtention d'un trouble, une coloration de Gram est effectuée. Les cultures sélectionnées lors de l'enrichissement sont utilisées pour effectuer des isollements sur différents milieux. Ces milieux sont les suivants : Rogosa, MRS, Mayeux et à l'acide nalidixique. Ces milieux d'isolement sont incubés à 30 °C (conditions mésophiles) et à 37 °C (conditions thermophiles) pendant 48 h. Les colonies issues du bouillon MRS sont repiquées sur gélose inclinée MRS et celles provenant du bouillon d'Elliker sur gélose inclinée d'Elliker. Pour chaque colonie isolée une coloration de Gram et le test de catalase ont été effectués. Après 24 h d'incubation à 30 °C, les souches bactériennes sont purifiées par un deuxième isolement. Les isolats bactériens sont caractérisés par observation microscopique de leur morphologie, par coloration de Gram et par recherche d'une activité catalasique. L'aptitude à produire du CO₂ est testée en bouillon MRS contenant une cloche de Durham et leur faculté à croître à 10 °C pendant 7 j et à 45 °C pendant 2 j est analysée en bouillon d'Elliker ou en bouillon de MRS, en fonction de leur bouillon initial d'isolement. L'halotolérance est testée en bouillon Elliker à 6,5 % (p/v) en NaCl. La capacité à hydrolyser l'arginine (1% p/v) et à métaboliser l'esculine est aussi observée. Le profil glucidique a été déterminé à l'aide des galeries API 50 CHL (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

3.5.3 Culture des souches bactériennes de référence

Le **Tableau 11** présente les milieux de culture, la température et la durée d'incubation spécifiques pour chaque espèce de bactéries lactiques. Ces cultures bactériennes sont utilisées pour inoculer les caillés témoins préparés selon la description faite au paragraphe 3.5.5.3.1.

Tableau 11. Souches de référence utilisées au cours de cette étude

Espèces bactériennes	Codes souches	Milieu de culture	Conditions d'incubation	
			Température (°C)	Temps (h)
<i>S. thermophilus</i>	DSM 20617 ^T	M17 Agar	37	24
<i>E. faecium</i>	DSM 20477 ^T	M17 Agar	37	24
<i>E. durans</i>	CIP 55125 ^T	M17 Agar	37	24
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CIP 7056 ^T	M17 Agar	30	24-48
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	MG1363 ^a	M17 Agar	30	24-48
<i>Lb. curvatus</i>	DSM 20019 ^T	M17 Agar	37	24
<i>Lb. plantarum</i>	DSM 20174 ^T	M17 Agar	37	24

CIP, Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France; DSM, Deutsche Sammlung von Mikro Organismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany, ^aGasson (1983)

3.5.4 Extraction d'ADN génomique

3.5.4.1 A partir d'un bouillon de culture

L'ADN chromosomique est extrait à partir de 1 mL de culture bactérienne. Après centrifugation (4 °C, 5 min, 10 000g), le culot bactérien est remis en suspension dans 3 volumes de tampon TRIS EDTA (50 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA; pH 8) contenant de la Rnase A (100 µg.mL⁻¹) et du lysozyme (10 mg.mL⁻¹). Cette suspension est incubée à 33 °C pendant 2 h sous agitation. L'ADN génomique est ensuite purifié par extraction au phénol/chloroforme/isoamyl alcool (Amresco), précipité par un large excès d'isopropanol, puis lavé avec de l'éthanol 70 % avant d'être solubilisé dans 30 µL d'eau ultra pure stérile (MilliQ) (Dubernet *et al.*, 2002).

3.5.4.2 A partir de la masse fromagère

L'extraction d'ADN chromosomique à partir de la matrice des fromages *Darfiyeh*, a été effectuée selon le protocole proposé par Ogier *et al.* (2002). Une masse de 4 g de fromage est mise en suspension dans 40 mL de tampon citrate et homogénéisée au stomacher (Interscience, St-Nom-la-Bretèche, France). A chaque échantillon, 1,6 µL de pronase (Protease de *Streptomyces griseus*, EC.3.4.24.31, Sigma) à 20 mg.mL⁻¹ H₂O et 80 µL de β-mercaptoéthanol sont ajoutés, puis incubés à 37 °C pendant 3 h. La suspension bactérienne est centrifugée à 10 000g pendant 10 min à 4 °C. Le culot est redispersé dans 10 mL d'H₂O stérile, puis dans 10 mL de tampon T1

(1M sorbitol, 0,1M EDTA; pH 8). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et le culot est dispersé dans 500 µL de tampon T1, puis refroidi pendant 10 min dans la glace. Les cellules bactériennes sont lysées par ajout de billes en verre (diamètre 150 à 200 µm; Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) en présence de tampon T1 (6 cycles : vortex 30 s, 1 min dans la glace). Le surnageant (~ 400 µL) est récupéré puis incubé pendant 10 min dans la glace. L'ADN génomique est purifié selon le protocole décrit au paragraphe 3.5.4.1.

3.5.5 Amplification d'ADN génomique

Les oligonucléotides définis pour chaque espèce bactérienne et utilisés pour les amplifications par Polymerase Chain Reaction (PCR), ainsi que leurs caractéristiques, ont été décrits dans la littérature et obtenus chez Eurogentec (Herstal, Belgique) (**Tableau 12**).

Tableau 12. Caractéristiques des couples d'amorces spécifiques des espèces bactériennes étudiées

Espèce bactérienne	oligonucléotides	Séquence (5' → 3')	Gène cible	Produit (pb)	Références
<i>S. thermophilus</i>	St1 St2	TTATTTGAAAGGGGCAATTGCT GTGAACCTTCCACTCTCACAC	gène lac Z	260	Furet <i>et al.</i> (2004)
<i>E. faecium</i>	EM1A EM1B	TTGAGGCAGACCAGATTGACG TATGACAGCGACTCCGATTCC	non identifié	658	Cheng <i>et al.</i> (1997)
<i>E. durans</i>	DuHiF DuR	TTATGTCCCWGTWTTGAAAAATCAA TGAATCATATTGGTATGCAGTCCG	gène ddl*	186	Kniff <i>et al.</i> (2001)
<i>Lc. lactis</i>	His1 His2	CTTCGTTATGATTTTACA CAATATCAACAATTCCAT	opéron histidine	933	Corroler <i>et al.</i> (1999)
Eubactéries	HDA1GC HDA2	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGG GCGGGGGCACGGGGGGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGT GTATTACCGCGGCTGCTGGCA	région V3 de l'ADN 16S	700	Ogier <i>et al.</i> (2002)

* gène de D-alanine : D-alanine ligase

3.5.5.1 PCR-TTGE

La région V3 de l'ADN, codant l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), est amplifiée par PCR en utilisant les amorces universelles HDA1-GC et HDA2 (**Tableau 12**). Le milieu réactionnel (50 µL) est constitué de Taq polymerase Mix (10 mM Tris-HCl [pH 9,0], 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 200 µM dNTPs, 60 pmol de chaque amorce, 2,5 U Taq polymerase et 1 µL d'ADN bactérien. L'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA). La réaction d'amplification consiste en une incubation à 94 °C pendant 4

min suivie de 30 cycles de trois étapes : 30 s de dénaturation à 94 °C, 30 s d'hybridation à 58 °C et 1 min d'extension à 68 °C, suivie d'une extension finale de 7 min à 68 °C.

L'électrophorèse est réalisée en gel d'agarose à 1,5 % (p/v). Le Smart ladder SF (Eurogentec) est utilisé comme marqueur de taille (de 100 à 1000 pb).

Les analyses en Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE) ont été réalisées avec le système universel de détection de mutation (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) selon Ogier *et al.* (2002). Les gels contiennent 8 % (p/v) d'acrylamide, de l'urée 7 M et du tampon TAE (1X). La migration est réalisée sous une tension de 41 V pendant 16 h (Electrophoresis Power Supply, Avantec, Belgique) avec un gradient de température de 63 °C à 70 °C, à raison de 0,4 °C. h⁻¹.

Après électrophorèse, l'ADN est coloré par immersion du gel dans une solution de SYBR Safe (Invitrogen) pendant 30 min. Le gel est ensuite immergé dans de l'eau distillée pendant 1h. Les bandes sont ensuite visualisées et photographiées par transillumination ultraviolette.

3.5.5.2 PCR classique

Le milieu réactionnel et les conditions d'amplification, correspondant à chaque espèce bactérienne, sont décrits dans le **Tableau 13**.

Les produits d'amplification sont ensuite soumis à une électrophorèse en gel d'agarose (Agarose Type D-5 DNA grade, Euromedex, France) à 1,5 % (p/v) selon les techniques standard. La migration est réalisée sous une tension de 100 V pendant 3 h (Electrophoresis Power Supply, Avantec, Belgique) ; les bandes sont ensuite visualisées sous transillumination ultraviolette et photographiées pour archivage. Le Smart Ladder SF (Eurogentec, Seraing, B) est utilisé comme marqueur de taille (de 100 à 1000 pb).

Tableau 13. Conditions d'amplification pour chaque espèce bactérienne recherchée

Conditions opératoires	Flores bactériennes recherchées			
	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Paramètres d'amplification				
PCR Tampon (1,5 mM MgCl ₂ (μL))	5	5	5	5
Amorce sens (μM)	3	1	1,25	0,5
Amorce anti-sens (μM)	3	1	1,25	0,5
dNTPs (μM)	200	200	300	200
MgCl ₂ (25mM)	2	5	6	-
<i>Taq</i> DNA polynérase (U)	0,25	0,5	0,5	1,5
ADN génomique (μL)	2	2	2	2
Cycles d'amplification				
Nombre de cycles	30	30	30	30
Température d'hybridation (°C)	55	60	57	45
Durée d'hybridation (s)	30	45	60	120

3.5.5.3 PCR quantitative en temps réel

3.5.5.3.1 Préparation de caillés témoins

Un volume de 500 mL de lait cru de vache réfrigéré et conditionné à la ferme, (étable à patente sanitaire N° 54026, ferme laitière d'Harlauville à Thienville Reignier), sont pasteurisés à 60 °C pendant 30 min. L'emprésurage est réalisé avec 0,25 mL d'extrait de présure (NATUREM™, Batch N° 2543547, CHR Hansen, Aprajon, Cedex, France). La coagulation a lieu après 60 à 90 min d'incubation à 37 °C. Le découpage du lait caillé est suivi de l'égouttage en conditions stériles.

Une masse de 10 g de fromage est homogénéisée avec 90 mL de tampon citrate (0,5 M ; pH 7,0) à l'aide d'un stomacher (Interscience, Saint-Nom-La Bretèche, France) pendant 3 min.

Un millilitre d'une culture de *S. thermophilus* (DSM 20617^T) est ajouté à cette suspension. Cette dernière est soumise à des dilutions décimales. Les caillés témoins sontensemencés avec les autres espèces bactériennes (*E. durans* (CIP 55125^T), *E. faecium* (DSMZ 20477^T) et *Lc. lactis* subsp. *lactis* (CIP 7056)) de la même manière. Les dilutions décimales ont été utilisées pour ensemencer un milieu M17 gélosé coulé en boîtes de Petri pour effectuer des numérations bactériennes.

Ces numérations permettront d'établir une courbe étalon mettant en rapport la quantité d'ADN mesuré par PCR quantitative et le nombre d'ufc.mL⁻¹.

3.5.5.3.2 Conditions d'amplification

Les analyses de PCR quantitative ont été effectuées dans un thermocycleur (LightCycler, LC-PCR system, Roche). Le milieu réactionnel de la PCR (20 μ L) contient 1X LightCycler FastStart DNA Master Plus Syber Green I (Roche), une concentration appropriée d'amorces (30 μ M St1/St2; 200 μ M EM1A/EM1B) et 2 μ L de solution d'ADN génomique. Les cycles de réaction de polymérisation en chaîne utilisés sont décrits dans le **Tableau 13**.

3.6 Analyse de la peau de chèvre

Comme déjà mentionné dans la section 3.1.2. et dans les conditions de prise des échantillons de *Darfiyeh*, le lien fixé au niveau cou du *Dariff* est défait, puis est resserré afin de refermer hermétiquement l'outre de manière à éviter toute entrée d'air.

Pour les besoins de notre étude, l'échantillonnage des morceaux de peau de chèvre (*Capra hircus*) a été réalisé au cours des trois productions distinctes de *Darfiyeh* (A, B et C), réalisées à un intervalle de 20 jours. A chaque fois que le *Dariff* est resserré et refermé, un morceau de peau est prélevé à 20, 40 et 60 jours d'affinage, suivi d'un salage direct à la louche (~ 1-1,5 kg) en vue de sa conservation.

Ces morceaux de peau sont sujets aux analyses microbiologiques (numérations bactériennes classiques), physico-chimiques (taux d'humidité et taux d'azote total) et à une évaluation qualitative (chute de poils et odeur de putréfaction).

3.6.1 Numérations bactériennes classiques

Des échantillons de peau de 5 g sont additionnés de 50 mL d'eau stérile, sous agitation à 1000g pendant 30 min. Un millilitre de cet extrait est additionné à 9 mL d'eau stérile. Un aliquot de 0,1 mL de cette solution est utilisé pour ensemercer de la gélose nutritive incubée à 37 °C pendant 48 h (Cruickshank, 1965). Le dénombrement bactérien est effectué sur trois morceaux de peau. Les résultats sont exprimés en pourcentage pour deux essais indépendants. Les colonies formées sont comptées et les résultats sont exprimés en ufc.g⁻¹ de peau.

3.6.2 Dosage du taux d'humidité

Des morceaux de peau aux dimensions définies ont été découpés et soigneusement rasés, de façon à éviter les variations du taux d'humidité. Ils sont ensuite pesés et séchés dans une étuve à 50-60 °C pendant 5-6 h (Bureau Indien des Standards (BIS), 1971). Les résultats sont exprimés

en pourcentage pour deux essais indépendants. L'humidité totale est définie selon la formule décrite au paragraphe 3.2.3.2.

3.6.3 Dosage de l'azote total

Des morceaux de peau de 5 g rasés ont été traités par 9 fois leur volume en eau distillée, puis mis dans une bouteille sous agitation continue à 23-27°C pendant 3 h, en vue d'extraire les composés représentant l'azote soluble (albumines, globulines) (BIS, 1971). Le mélange a été ensuite filtré sur papier, puis introduit dans des matras en vue d'une minéralisation à 420 °C pendant 3 h, suivie d'une distillation selon la procédure décrite au paragraphe 3.2.2.4. Les résultats sont exprimés en pourcentage pour deux essais.

3.6.4 Détermination de la stabilité hydrothermique de la peau

La stabilité thermique est estimée par la température de rétrécissement du morceau de peau, en cours d'analyse. Normalement, la stabilité est mesurée grâce à un appareil destiné à cette fin (*Shrinkage meter*). Etant donné la non disponibilité de cet appareil, un dispositif a été mis en place. A cet effet, des morceaux de peau de dimensions définies ont été trempés dans une solution de glycérol/eau (70:30, v/v) et placés dans un bain d'eau. Ce dispositif a subi des montées progressives en température à partir de 35 °C à raison de 3-5 °C.min⁻¹. La température à laquelle la peau commence à se rétrécir a été notée comme température de rétrécissement spécifique. En raison de l'imprécision de ce montage expérimental, la détermination de la stabilité hydrothermique de tous les échantillons de peau n'a pas été effectuée ; la température de rétrécissement du morceau de peau du *Dariff* A à 20 jours d'affinage a été enregistrée, et ceci dans le but de percevoir toute déstabilisation structurale de la matrice de la peau due à l'attaque microbienne.

3.6.5 Etude de transfert dans un système aliment simulé/peau

Les morceaux de peau de chèvre, utilisés pour les montages expérimentaux afin de simuler les transferts moléculaires au contact de la peau, n'ont pas été prélevés des *Dariff* servant à l'affinage du *Darfiyeh*. Ils sont issus d'un *Dariff* préparé comme indiqué au paragraphe 3.1.1.1.

3.6.5.1 Description du module expérimental et mise en place

Le *Darfiyeh* s'affinant dans la peau de chèvre, nous avons tenté de mettre en évidence, grâce à un montage spécifique, les transferts de substances aromatiques susceptibles de se produire à travers cette paroi naturelle en utilisant des molécules aromatiques modèles.

A cet effet, deux compartiments A et B en verre Pyrex[®], d'une capacité 250 mL chacun, servant initialement comme unités de filtration (Millipore), ont été fermés par des bouchons en caoutchouc. Ces derniers sont couverts par du papier aluminium afin de rendre le système le plus étanche possible. Les deux compartiments A et B sont séparés par une peau de chèvre et sont fixés au moyen d'une pince métallique (**Figure 12**). Le montage expérimental est maintenu à la température ambiante de 20 °C. La peau de chèvre est rincée avec de l'eau distillée avant toute manipulation.

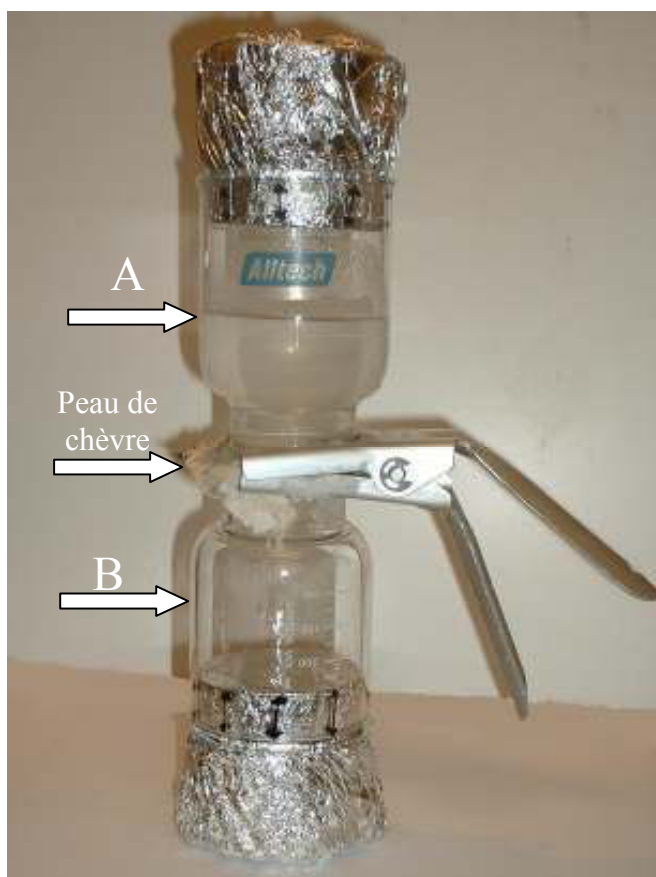


Figure 12. Montage expérimental pour la simulation des transferts moléculaires au contact de la peau de chèvre (deux compartiments A et B séparés par une peau de chèvre)

3.6.5.2 Tests de perméabilité et d'absorption d'acétonitrile dans un système solution aqueuse/peau

3.6.5.2.1 Préparation de la solution

Une solution de 99 mL H₂O distillée + 1 mL d'acétonitrile (Sigma-Aldrich, France) est fortement agitée, puis placée dans le compartiment A. Le choix de la molécule d'acétonitrile portait surtout sur ses propriétés physico-chimiques, notamment son point d'ébullition (81,6 °C) et sa masse molaire (41,05 g. mol⁻¹). Le système est monté comme indiqué dans la **Figure 12** ci-dessus, pendant une durée de 7 jours. Un module identique a été monté pour une durée de 25 jours.

3.6.5.2.2 Tests de perméabilité

Une fraction aliquot de gaz de 250 µL contenu dans le compartiment B, a été prélevée au moyen d'une seringue à gaz (SGE, Australie). L'injection est effectuée dans un chromatographe à espace de tête Perkin-Elmer 8500 Gas équipé d'une colonne capillaire SupelcowaxTM (Supelco, Bellefonte, PA, USA) (longueur : 60 m, diamètre interne : 0,32 mm, épaisseur du film : 1 µm) et d'un détecteur à ionisation de flamme. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées à 250 °C. La température initiale de la colonne de 45 °C est maintenue pendant 1 min, puis elle augmente de 45 à 240 °C à raison de 5 °C. min⁻¹ et elle est maintenue 12 min à 240 °C. L'analyse est répétée trois fois.

3.6.5.2.3 Tests d'absorption

Une fois les tests de perméabilité effectués, le montage expérimental est défait. La peau de chèvre est alors placée dans un flacon en verre "espace de tête" de capacité 12 mL, fermé par une capsule magnétique avec septum en silicone-PTFE (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Après une incubation de 45 min à 120 °C, l'analyse chromatographique est effectuée dans les conditions décrites au paragraphe 3.6.5.2.2. L'analyse est répétée trois fois.

3.6.5.3 Tests de perméabilité et d'absorption des molécules aromatiques dans un système solution simulée de *Darfiyeh*/peau

3.6.5.3.1 Préparation et choix des molécules modèles

Nous avons tenté d'évaluer le transfert de molécules aromatiques modèles à travers la peau de chèvre en utilisant une solution simulée de fromage *Darfiyeh*. Les composés volatils suivants : 2-butanone, 2,3-butanedione et 2-butanol ont été fournis par Sigma-Aldrich (France). Le choix de ces molécules portait surtout sur leurs propriétés physico-chimiques, notamment leur point d'ébullition et leur masse molaire.

La solution simulée de *Darfiyeh*, d'un volume total de 25 mL à 5 % de teneur en NaCl, est composée de : 24, 25 mL H₂O distillée + 0,25 mL 2-butanone + 0,25 mL 2,3-butanedione + 0,25 mL 2-butanol. Cette solution aqueuse est bien agitée avant d'être introduite dans le compartiment A du montage expérimental illustré précédemment dans la **Figure 12**.

3.6.5.3.2 Etalonnage des molécules modèles

Des mélanges constitués des trois molécules modèles (v/v/v) de volume final de 75, 125, 250, 500 et 750 μ L, ont été introduits séparément dans des flacons en verre de type "espace de tête" d'une capacité 12 mL. Ces derniers sont fermés par une capsule magnétique avec septum en silicone-PTFE (Supelco, Bellefonte, PA, USA), maintenus pendant 45 min à 120 °C avant analyse dans les conditions décrites au paragraphe 3.6.5.2.2. Des temps de rétention de 15,84 , 18, 30 et de 19,53 ont été enregistrés respectivement pour 2-butanone, 2,3-butanedione et 2-butanol.

Le but est d'observer une bonne corrélation entre les différentes concentrations de chaque molécule modèle et leur réponse de détection. Les courbes d'étalonnage des molécules modèles, ainsi que les paramètres de régression linéaire, notamment l'équation de la droite et le coefficient de corrélation (R^2) correspondant, sont illustrées dans la **Figure 13**.

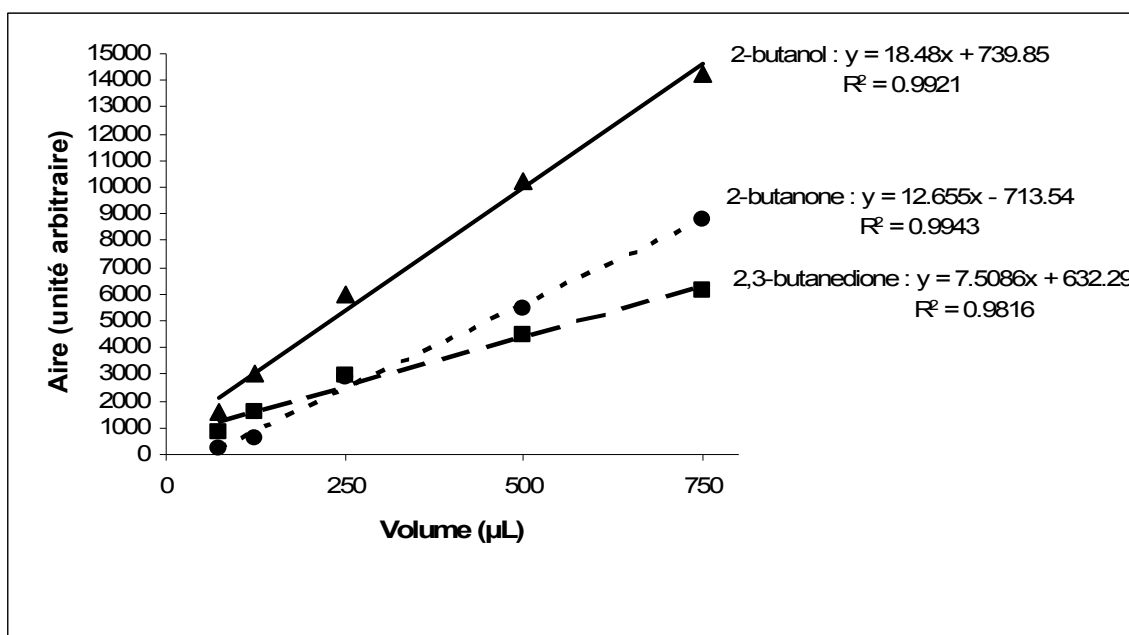


Figure 13. Courbes d'étalonnage de 2-butanol, 2,3-butanedione et 2-butanone

3.6.5.3.3 Montage du système de 20, 40 et 60 jours

Trois modules séparés ont été montés pour une durée de 20, 40 et 60 jours (à la même fréquence de prélèvement de nos échantillons de *Darfiyeh*). L'épaisseur du morceau de peau destiné à séparer les deux compartiments A et B, est mesurée avec un micromètre (Messmer, Londres). La moyenne de dix mesures est prise en compte pour noter l'épaisseur moyenne de l'échantillon.

Les tests de perméabilité et d'absorption ont été effectués comme décrit précédemment aux paragraphes 3.6.5.2.2. et 3.6.5.2.3.

Trois mesures ont été effectuées pour toutes les analyses de perméabilité et d'absorption. La moyenne de ces trois mesures n'est pas prise en compte ; le compartiment B de notre montage est percé par l'aiguille pour la première injection correspondante au test de perméabilité. Le module expérimental n'est plus considéré comme étanche. De ce fait, les valeurs de la première mesure ont été enregistrées pour les tests de perméabilité et d'absorption. Deux modules sont montés séparément pour une durée de 60 jours afin de vérifier la répétabilité des résultats.

3.7 Traitement statistique des données

Les données expérimentales sont statistiquement testées par l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de LSD (*Least Squares Difference*), afin de déterminer la présence de différences significatives entre les paramètres de composition physico-chimique et microbiologique à différentes périodes d'affinage (20, 40, 60 jours) entre les différents lots de production de

Darfiyeh A, B et C. Le logiciel GenStat® 4,2 (5^{ème} Edition, 2000, Lawes Agricultural Trust) a été utilisé. Le seuil de signification de 0,05 est retenu.

4. Résultats et discussion

4. Résultats et discussion

4.1 Caractérisation physico-chimique du fromage *Darfiyeh*

Cette étude a été conduite dans le but de caractériser la protéolyse et la lipolyse, ainsi que la fraction volatile du fromage *Darfiyeh* au cours de la période d'affinage. La composition des laits destinés à la production du *Darfiyeh* a été déterminée. Les paramètres de composition fromagère comme le pH, les taux d'humidité, de matière grasse et de NaCl ont été effectués. La protéolyse a été suivie d'après l'évolution des fractions azotées, l'azote non caséinique et l'azote non protéique. La lipolyse a été suivie à travers l'évolution de l'indice d'acide de la matière grasse au cours de l'affinage.

4.1.1 Laits destinés à la fabrication du *Darfiyeh*

La composition des laits de chèvre revêt une importance considérable puisque l'essentiel de la production laitière est destiné à la fabrication des fromages *Darfiyeh*.

4.1.1.1 Composition

Les laits utilisés dans la fabrication des fromages *Darfiyeh* sont issus des troupeaux de chèvres appartenant à la population locale ou "*Baladi*", la plus adaptée aux conditions environnementales existantes (Abi Saab *et al.*, 1997) et dont la composition est présentée dans le **Tableau 14**.

Tableau 14. Composition moyenne des laits de chèvre destinés à la production de trois lots de Darfiyeh (A, B et C)^x, n=3

Composition	Production		
	A	B	C
Matière grasse (%)	4,11±0,03 ^a	4,70±0,00 ^a	5,05±0,33 ^b
Extrait sec dégraissé (%)	8,70±0,03	8,66±0,01	8,48±0,68
Protéines (%)	3,67±0,01 ^a	3,81±0,00 ^b	3,80±0,35 ^b
Lactose (%)	4,31±0,01	4,15±0,00	4,06±0,27
Minéraux (%)	0,72±0,01	0,70±0,00	0,69±0,05

^xA, B et C à intervalles de 20 jours,

n : nombre de répétitions,

^{a, b} les valeurs moyennes dans le même rang avec des exposants différents sont significativement différents ($p < 0,05$)

En comparant la composition des laits de chèvre à celle des laits de vache et de brebis, il apparaît une différence de composition. D'après la littérature (Park *et al.*, 2007), la teneur en lipides et en protéines des laits de chèvre est légèrement supérieure à celle des laits de vache, mais elle est inférieure à celle des laits de brebis. Cependant, les résultats obtenus ici sont un peu plus élevés que ceux rapportés dans la littérature par Haenlein et Caccese (1984) et moins élevés que ceux rapportés par Fresno *et al.* (1996). Par ailleurs, les travaux sur la race *Baladi* sont très limités ; Hosri (2003), en travaillant sur l'effet de l'incorporation d'enveloppes de sésame et de brisures de lentilles dans la ration sur la production et la composition du lait de chèvre au Liban, a rapporté des valeurs de la matière grasse et des protéines concordantes avec nos résultats, et ceci dans la période allant de mai à juillet.

La variation de la composition peut être liée à de nombreux paramètres tels que la saison, la race, l'alimentation, le stade de lactation, la localisation géographique, les conditions environnementales et l'état sanitaire du troupeau (Park, 2006). Pizillo, *et al.* (2005) ont montré l'effet des races de chèvre sur les caractéristiques sensorielles, chimiques et nutritionnelles du fromage *Ricotta*. Soryal *et al.* (2004) ont montré que la composition du fromage *Domiat* (matière grasse, protéines et solides totaux) n'est pas affectée par les systèmes d'alimentation des chèvres laitières ayant bénéficié de rations alimentaires à différents niveaux de concentrés.

Par ailleurs, la teneur en matière grasse des laits de chèvre destinés à la production du lot C de *Darfiyeh* est plus élevée (5,05 %) que celle du lot A (4,11 %) et B (4,70 %). Cette différence pourra être expliquée par l'avancement du stade de lactation en C. La teneurs en matière grasse des laits de chèvre et de brebis augmente avec le stade de lactation alors que la teneur en lactose diminue (Haenlein et Wendorff, 2006). Il est donc nécessaire de prendre en compte la variabilité individuelle (stade de lactation notamment) pour maîtriser la composition des laits collectés.

4.1.1.2 Paramètres physiques

Les paramètres physiques des laits de chèvre destinés à la production des trois lots de production du *Darfiyeh* sont présentés dans le **Tableau 15** ci-dessous. Comme on peut le voir, il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$) entre la densité (30,8-31,2 %) et le pH (6,7-6,9) au niveau des productions. En comparant ces valeurs à celles des laits de vache et de brebis de la littérature (respectivement Jenness *et al.*, 1974 ; Haenlein et Wendorff, 2006), il apparaît que la densité des laits de chèvre est similaire à celle des laits de vache, mais elle est inférieure à celle des laits de brebis.

Tableau 15. Quelques paramètres physiques des laits de chèvre destinés à la production de trois lots de *Darfiyeh* (A, B et C)^x, n=3

Paramètre physique	Production		
	A	B	C
Densité (%)	31,06±0,11	30,81±0,04	31,25±2,39
Conductivité (ms.cm ⁻¹)	5,21±0,00 ^c	3,68±0,04 ^a	4,07±0,04 ^b
Point de congélation (°C)	0,51±0,00 ^c	0,49±0,00 ^a	0,50±0,00 ^b
pH	6,69±0,10	6,69±0,00	6,89±0,08

^xA, B et C à intervalles de 20 jours,

n : nombre de répétitions,

^{a, b} les valeurs moyennes dans le même rang avec des exposants différents sont significativement différents ($p < 0,05$)

Quant au pH (6,7-6,9), il est relativement peu différent de celui des laits de vache (6,65-6,71) et de brebis (6,51-6,85). De plus, les mesures de conductivité et du point de congélation sont significativement différentes ($p < 0,05$) entre les trois lots de production du *Darfiyeh* et concordants avec ceux de la littérature (Juarez et Ramos, 1986).

4.1.1.3 Analyse des acides gras

Les résultats de la composition en acides gras des laits de chèvre destinés à la production des différents lots de *Darfiyeh* présentés dans le **Tableau 16** montrent une teneur élevée en cinq acides gras (C10:0, C14:0, C16:0, C18:0 et C18:1) et dont les valeurs pour les trois lots de production sont respectivement A (86,32 %), B (85,40 %) et C (87,45 %). Les triglycérides constituent la majeure partie des lipides du lait (~ 98 %), regroupant un grand nombre d'acides gras estérifiés. Le groupe des cinq acides gras mentionnés ci-dessus constituent au moins 75 % du total des acides gras des laits de chèvre et de brebis (Park *et al.*, 2007).

Les teneurs moyennes en acides gras à chaînes courtes et moyennes sont significativement plus élevées dans les laits de chèvre des trois lots de production par rapport au lait de vache. Ainsi, l'acide caproïque (C6:0) intervient respectivement pour 2,35 %, 2,26 %, et 1,66 %, l'acide caprylique (C8:0) pour 2,76 %, 2,70 % et 2,61 %, l'acide caprique (C10:0) pour 9,71 %, 9,82 % et 9,93 % et l'acide laurique (C12:0) pour 3,80 %, 3,82 % et 3,93 % (Goudjil *et al.*, 2004). Ces acides gras, notamment les C6:0, C8:0 et C10:0 sont responsables de la flaveur caractéristique des fromages de chèvre.

Le niveau d'alimentation demeure l'un des facteurs d'élevage qui affecte la production et la composition du lait. Ceci pourrait expliquer les différences significatives ($p < 0,05$) entre le lot C et les deux lots A et B. Les laits destinés à la production des deux lots A et B sont issus de troupeaux de chèvres alimentées à l'herbe, avec des suppléments en concentrés, alors que le lot C est uniquement alimenté à l'herbe. Plusieurs travaux apparaissant dans la littérature (LeDoux *et al.*, 2002 ; Sanz Sampelayo *et al.*, 2002) ont évoqué les changements de composition des acides gras des laits de chèvres selon différents types de régimes alimentaires. Nos résultats sont concordants avec les travaux de Soryal *et al.* (2004), qui ont montré que le fromage Egyptien *Dommati* contient une teneur basse en acides gras à courtes chaînes quand des chèvres laitières ont été alimentées à l'herbe sans supplémentation de concentrés par rapport à celles recevant des rations alimentaires de concentrés.

Tableau 16. Composition en acides gras (%) des lipides totaux des laits de chèvre destinés à la production de trois lots de *Darfiyeh* (A, B et C)^x extraits selon la méthode de Röse - Gottlieb, n=3

Acides gras (%acides gras identifiés)	Production		
	A	B	C
C6:0	2,35±0,04 ^{cd}	2,26±0,04 ^{bd}	1,66±0,00 ^a
C8:0	2,76±0,04 ^{cd}	2,70±0,00 ^{bd}	2,61±0,00 ^a
C10:0	9,71±0,05 ^a	9,82±0,05 ^{ab}	9,93±0,04 ^b
C12:0	3,80±0,05	3,82±0,08	3,93±0,04
C14:0	10,59±0,06 ^a	10,34±0,24 ^a	11,13±0,09 ^b
C16:0	29,16±0,14 ^{ac}	28,66±0,47 ^a	29,78±0,05 ^{bc}
C18:0	15,96±0,03	15,66±0,47	16,25±0,00
C18:1	20,90±0,04 ^{bd}	20,92±0,05 ^{cd}	20,36±0,09 ^a
C18:2	1,31±0,01 ^a	1,33±0,04 ^a	1,55±0,03 ^b
C18:3	1,59±0,03	1,56±0,04	1,64±0,03

^xLaits de chèvre destinés à la production de trois lots de *Darfiyeh* (A, B et C) à intervalles de 20 jours,

n = nombre de répétitions,

^{a, b} les valeurs moyennes dans le même rang avec des exposants différents sont significativement différents ($p < 0,05$)

4.1.2 Fromages *Darfiyeh* au cours de l'affinage

Les valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques classiques (pH, taux d'humidité, teneur en matière grasse, taux de NaCl et teneur en protéines) sont présentées dans le **Tableau 17**. L'application du test de *LSD* nous a permis de noter des différences significatives ($p < 0,05$) entre ces paramètres et la période d'affinage d'une part et le lot de production d'autre part.

Tableau 17. Valeurs moyennes $\pm$ déviation standard des paramètres physico-chimiques pour trois lots de production de *Darfiyeh* (A, B et C)^x jusqu'à 60 jours d'affinage, n=3

Paramètre	20 jours			40 jours			60 jours		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
pH	5,10 $\pm$ 0,05 ^c	4,90 $\pm$ 0,09 ^{ab}	5,27 $\pm$ 0,02 ^d	4,87 $\pm$ 0,01 ^a	4,87 $\pm$ 0,06 ^a	4,92 $\pm$ 0,05 ^{ab}	4,99 $\pm$ 0,02 ^b	5,02 $\pm$ 0,05 ^{bc}	5,06 $\pm$ 0,06 ^c
Humidité (%)	58,06 $\pm$ 0,16 ⁱ	53,01 $\pm$ 0,11 ^d	56,77 $\pm$ 0,05 ^h	55,81 $\pm$ 0,05 ^g	50,28 $\pm$ 0,11 ^b	55,1 $\pm$ 0,13 ^f	54,15 $\pm$ 0,14 ^e	49,71 $\pm$ 0,23 ^a	52,63 $\pm$ 0,14 ^c
MG/MS (%)	40,76 $\pm$ 0,04 ^a	42,91 $\pm$ 0,11 ^b	43,83 $\pm$ 0,58 ^c	42,50 $\pm$ 0,37 ^b	42,64 $\pm$ 0,30 ^b	44,62 $\pm$ 0,36 ^d	43,46 $\pm$ 0,41 ^c	42,24 $\pm$ 0,42 ^b	43,47 $\pm$ 0,04 ^c
NaCl (g NaCl. kg ⁻¹ fr)	50,87 $\pm$ 1,44 ^d	32,27 $\pm$ 1,33 ^b	43,30 $\pm$ 1,56 ^c	58,23 $\pm$ 2,52 ^e	25,67 $\pm$ 4,25 ^a	39,93 $\pm$ 0,99 ^c	95,63 $\pm$ 0,63 ^f	30,13 $\pm$ 0,98 ^{ab}	52,50 $\pm$ 6,90 ^{de}
Protéines (% MS)	38,51 $\pm$ 1,10 ^e	28,61 $\pm$ 1,19 ^a	35,48 $\pm$ 0,55 ^{cd}	36,01 $\pm$ 0,16 ^{cd}	32,10 $\pm$ 0,99 ^b	34,44 $\pm$ 0,31 ^c	36,72 $\pm$ 0,72	31,21 $\pm$ 0,44	40,91 $\pm$ 1,25 ^f

^xA, B et C à intervalles de 20 jours,

n : nombre de répétitions,

^a, ^b les valeurs moyennes dans le même rang avec des exposants différents sont significativement différent ($p < 0,05$),

MG : matière grasse ; MS : matière sèche ; fr : fromage

4.1.2.1 Evolution des paramètres physico-chimiques classiques

4.1.2.1.1 pH

L'observation des valeurs expérimentales montre une diminution du pH qui atteint des valeurs comprises entre 4,87 et 4,92 à 40 j d'affinage. Après 40 jours et suite à cette acidification, le pH augmente à la fin de la période d'affinage avec des valeurs maximales aux alentours de 5. Normalement, les valeurs basses de pH sont liées à la forte production d'acide lactique à partir du lactose résiduel au cours de la fermentation. Toutefois, la disparition progressive de l'acide lactique pourrait expliquer l'augmentation du pH entre 40 et 60 j d'affinage. Cette diminution est évidemment liée à la dégradation de l'acide, mais aussi à la production de composés alcalins générés lors de la dégradation des protéines qui intervient au cours de l'affinage du *Darfiyeh*.

Par ailleurs, pour les fromages ayant une valeur initiale basse du pH, l'augmentation de ce paramètre pendant l'affinage est inférieure à celle des fromages montrant des valeurs de pH plus élevées (Lucey *et al.*, 1993). Nos résultats sont concordants avec les travaux de Fanni (1977) sur le *Camembert*, dont le pH varie de la même manière pendant l'affinage du fromage.

L'évolution du pH pendant l'affinage du *Darfiyeh* est identique pour les trois lots de production, avec des différences significatives ($p < 0,05$) à 20 j d'affinage, où la production C a la valeur de pH la plus élevée (5,27), sans différences significatives ($p > 0,05$) à 40 et 60 j d'affinage.

A 60 j d'affinage, une légère augmentation du pH a été notée avec des valeurs finales avoisinants 5. Ceci a été observé pour d'autres fromages de chèvre comme le *Palmero* (Gomez *et al.*, 1991), le *Credos* (Medina *et al.*, 1992), le *Cendrat del Montsec* (Carretero *et al.*, 1992), le *Valdeteja* (Carballo *et al.*, 1994), l'*Armada* (Fresno *et al.*, 1996) et le *Batzos* (Psoni *et al.*, 2003). Nos valeurs sont plus élevées que celles rapportées pour le fromage *Genestoso* fabriqué à partir du lait de vache cru (Arenas *et al.*, 2004), le *Manchego* à base du lait de brebis et/ou de chèvre cru (Cabezas *et al.*, 2007), le *Teleme* (Mallatou *et al.*, 2003) et le *Babia-Laciana* (Franco *et al.*, 2003) à partir du lait de chèvre.

Il s'avère important de noter que le pH est lié à la qualité du fromage ; un pH de 5,0 correspond à un fromage de bonne qualité, alors qu'un pH supérieur à 5,2 correspond à un fromage qui se détériore plus rapidement qu'un autre à un pH plus bas (Alais, 1984).

4.1.2.1.2 Taux d'humidité

Le taux d'humidité diminue légèrement ($p < 0,05$) au cours de l'affinage du *Darfiyeh*. Des valeurs de 54,15 %, 49,71 % et 52,63 % sont enregistrées respectivement pour les trois lots A, B et C, à 60 j d'affinage. Ces résultats sont très proches de ceux rapportés dans la littérature pour d'autres fromages de chèvre ou pour des fromages à base de lait de chèvre et de brebis comme la *Feta* (Georgala *et al.*, 2005), le *Garrotxa* (Saldo *et al.*, 2003), le *Majorero* (Calvo *et al.*, 2007), le *Babia-Laciana* (Franco *et al.*, 2003) et pour d'autres fromages de chèvre espagnols au lait cru au début de leur affinage (Fresno *et al.*, 1996 ; Buffa *et al.*, 2004). Il est remarquable que la perte d'eau soit la plus prononcée pendant les 40 premiers jours d'affinage du *Darfiyeh*, tout en restant relativement limitée. La cause principale est due à l'humidité relative élevée (85-95 %) dans la grotte d'affinage du *Darfiyeh*. De plus, l'outre de chèvre servant d'enceinte d'affinage peut être considérée comme une enceinte d'affinage type, qui évite l'évaporation rapide de l'eau à la surface du *Darfiyeh*.

Comme il est attendu, l'évolution du taux d'humidité est dépendante simultanément de la période d'affinage et du lot de production.

4.1.2.1.3 Taux de matière grasse

Le taux de matière grasse par rapport à la matière sèche dans les fromages *Darfiyeh* représente approximativement 43,46 %, 42,24 % et 43,47 % respectivement pour les trois lots A, B et C, à 60 j d'affinage. Ces valeurs sont inférieures à celles observées pour d'autres fromages de chèvre (Franco *et al.*, 2001). Il n'existe pas de différence significative ($p > 0,05$) pendant l'affinage du lot

B. Une légère augmentation ($p < 0,05$) est notée pour les deux lots A et C. Cependant, il faut signaler que la composition de la matière grasse évolue, ceci en raison de la lipolyse qui intervient au cours de l'affinage (voir section 4.2.2).

4.1.2.1.4 Taux de NaCl

Comme le montre le **Tableau 17**, le taux de NaCl varie considérablement d'un lot de production à un autre ($p < 0,05$), avec des valeurs minimales enregistrées pour le lot B (25,67 g NaCl. Kg⁻¹ fromage) à 40 j d'affinage. Ces variations nettes sont probablement dues à la méthode de salage pratiquée. Comme les fromages de lactosérum sont individuellement salés par saupoudrage des cristaux de sel à sec, il est fort possible qu'ils ne reçoivent pas la même quantité de sel. De plus, le degré de pénétration de sel dans les fromages *Darfiyeh* n'est pas uniforme et la diffusion du sel des fromages de lactosérum vers le *Darfiyeh* n'est pas contrôlée. Il est important de noter que le taux de NaCl dans les différents lots de production du *Darfiyeh* est non homogène à cause de la méthode de salage à la louche qui est pratiquée. La non-uniformité de la forme et de la taille des fromages artisanaux, ainsi que la méthode de salage pratiquée, expliquent les différences observées entre les teneurs en sel dans les fabrications artisanales (Park, 2001).

Il faut rappeler que le salage des fromages est une étape clé de la production, dont les effets sont multiples: contribuer directement à la saveur des fromages, contrôler la prolifération des bactéries "levains" et "non levains", régulariser l'activité des enzymes et faciliter la synérèse (Morris *et al.*, 1985).

4.1.2.1.5 Taux de protéines

Les taux de protéines (azote total x 6,38), exprimés en fonction du taux de la matière sèche n'évolue pas considérablement au cours de l'affinage du *Darfiyeh*. Les teneurs en protéines des deux lots A et C sont significativement plus élevées que celles du lot B à tous les stades de l'affinage ($p < 0,05$). A la fin de la période d'affinage, les taux de protéines sont légèrement supérieures à celles de la littérature pour le fromage *Babia-Laciana* (Franco *et al.*, 2003) et sont similaires à celles d'un fromage de chèvre artisanal à pâte mi-dure (Calvo *et al.*, 2007).

4.1.2.2 Evolution des fractions azotées

L'application du test *LSD* aux résultats des fractions azotées du *Darfiyeh* au cours de l'affinage montre des différences significatives ($p < 0,05$) (**Tableau 18**). La période d'affinage est le facteur principal affectant les indices de protéolyse (ANC, ANP) du *Darfiyeh*. La fraction ANC est utilisée avec la fraction ANP pour déterminer la nature de la protéolyse. L'ANC donne des informations sur l'activité des protéinases et caractérise l'affinage *en largeur* (dégradation des caséines vers des fragments solubles dans l'eau), alors que l'ANP est lié à l'activité des peptidases et caractérise l'affinage dans sa *profondeur* (dégradation de l'ANC vers des fragments plus petits) (Puhan et Steffen, 1967).

Tableau 18. Valeurs moyennes $\pm$ déviation standard des fractions azotées pour trois lots de production de *Darfiyeh* (A, B et C)^x jusqu'a 60 jours d'affinage, n=3

Fractions azotées	20 jours			40 jours			60 jours		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
NT (% MS)	6,54 $\pm$ 0,16 ^d	5,05 $\pm$ 0,21 ^a	6,04 $\pm$ 0,12 ^{bc}	6,55 $\pm$ 0,02 ^d	5,79 $\pm$ 0,20 ^b	6,17 $\pm$ 0,05 ^c	6,69 $\pm$ 0,14 ^d	5,98 $\pm$ 0,08 ^{bc}	7,67 $\pm$ 0,18 ^c
ANC (% NT)	8,95 $\pm$ 0,24 ^a	13,16 $\pm$ 0,50 ^b	8,80 $\pm$ 0,50 ^a	16,70 $\pm$ 0,82 ^{cd}	15,90 $\pm$ 0,43 ^c	17,12 $\pm$ 0,35 ^{de}	17,79 $\pm$ 0,18 ^c	21,96 $\pm$ 0,20 ^e	20,14 $\pm$ 0,52 ^f
ANP (% NT)	7,70 $\pm$ 0,45 ^a	11,30 $\pm$ 0,24 ^b	8,01 $\pm$ 0,44 ^a	13,89 $\pm$ 0,08 ^d	13,10 $\pm$ 0,41 ^c	12,59 $\pm$ 0,38 ^c	14,03 $\pm$ 0,17 ^d	18,24 $\pm$ 0,17 ^f	16,49 $\pm$ 0,51 ^e

^xA, B et C à intervalles de 20 jours,

n : nombre de répétitions,

^{a, b}Valeurs moyennes dans le même rang avec des exposants différents sont significativement différents ($p < 0,05$),

NT : azote total ; MS : matière sèche ; ANC : azote non caséinique ; ANP : azote non protéique

Les valeurs de l'azote total des trois lots de production du *Darfiyeh* varient de 5,05 % à 7,67 % (**Tableau 18**). Les valeurs de l'ANC et de l'ANP augmentent significativement et de façon similaire ($p < 0,05$). Nos valeurs enregistrées pour les différents indices de protéolyse sont supérieures à celles rapportées dans la littérature pour d'autres fromages de chèvre, comme l'*Armada* (Fresno *et al.*, 1997), le *Valdeteja* (Carballo *et al.*, 1994) et le *Babia-Laciana* (Franco *et al.*, 2003).

Les fractions azotées des deux lots A et C ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) au niveau de leur évolution à 20 j d'affinage. Les valeurs moyennes de l'ANC de ces deux lots doublent de 20 à 40 j d'affinage (respectivement 8,95 %, 16,70 % ; 8,80 %, 17,12 %) avec peu de variation entre 40 et 60 j d'affinage. Une évolution quasi-similaire est observée pour les valeurs de l'ANP des deux lots A et C.

A 20 j d'affinage, les valeurs de l'ANC et de l'ANP du lot B sont respectivement de 13,16 % et 11,30 %, supérieures à celles des deux lots A et C. En comparant le fromage *Manchego* avec des quantités réduites de sel et le *Manchego* avec des quantités de sel traditionnelles (Pavia *et al.*, 1999), ce dernier présentait des valeurs plus élevées d'ANC. On sait que le taux de NaCl et la méthode de salage pratiquée affectent la protéolyse ; des taux élevés de NaCl sont liés à une protéolyse retardée (Park, 2001). Il est clair que la protéolyse a été retardée pour les deux lots A et C pendant les 20 premiers jours d'affinage.

A 40 j d'affinage, la protéolyse est plus prononcée pour les trois lots de production du *Darfiyeh* A, B et C. Ceci semble être dû à l'équilibre entre les taux d'humidité et de NaCl. Le taux d'humidité est aussi considéré un facteur affectant le degré de protéolyse ; des taux élevés de NaCl et des taux bas d'humidité pourraient justifier l'activité protéolytique basse observée dans des fromages artisanaux (Calvo *et al.*, 2007). Ces deux conditions observées avec le lot B en comparaison avec les deux lots A et C peut expliquer la protéolyse plus avancée en B.

4.1.3 Fractions lipidiques du *Darfiyeh* au cours de l'affinage

4.1.3.1 Classes de lipides totaux

La composition en classes des lipides totaux (lipides neutres et lipides polaires) de la matière grasse du *Darfiyeh* extraite selon la méthode de Folch *et al.* (1957) a été analysée par chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Iatroscan®).

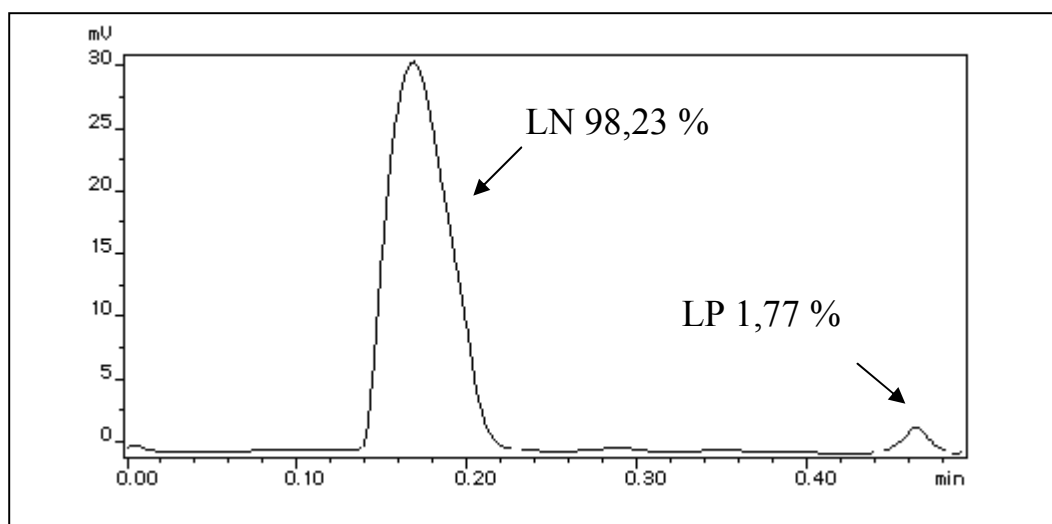


Figure 14. Classes de lipides totaux de la matière grasse du *Darfiyeh* extraits par la méthode de Folch *et al.* (1957) et déterminées par Iatroscan®, production A à 60 j d'affinage, LN : lipides neutres, LP : lipides polaires

Les résultats montrent que la teneur moyenne en lipides neutres est majoritaire dans les trois lots de production A, B et C qui en contiennent respectivement 97,41 %, 97,61 % et 97,95 %, contre seulement 2,59 %, 2,39 % et 2,05 % pour les lipides polaires. Il est évident que les lipides neutres constituent la majeure partie de la matière grasse du *Darfiyeh* (**Figure 14**) ; environ 98 % des lipides du lait sont en effet des lipides neutres (Haenlein et Wendorff, 2006).

Par ailleurs, au sein de chaque lot de production du *Darfiyeh* A, B et C, les valeurs moyennes des lipides neutres augmentent légèrement mais progressivement en fonction de la période d'affinage, soit respectivement 96,67 %, 97,34 % et 98,23 % ; 96,66 %, 97,55 % et 98,62 % ; 97,89 %, 96,85 % et 99,12 %, contre une diminution des proportions des lipides polaires, soit 3,33 %, 2,66 % et 1,77 % ; 3,34 %, 2,45 % et 1,38 % ; 2,11 %, 3,15 % et 0,88 % (**Figure 15**).

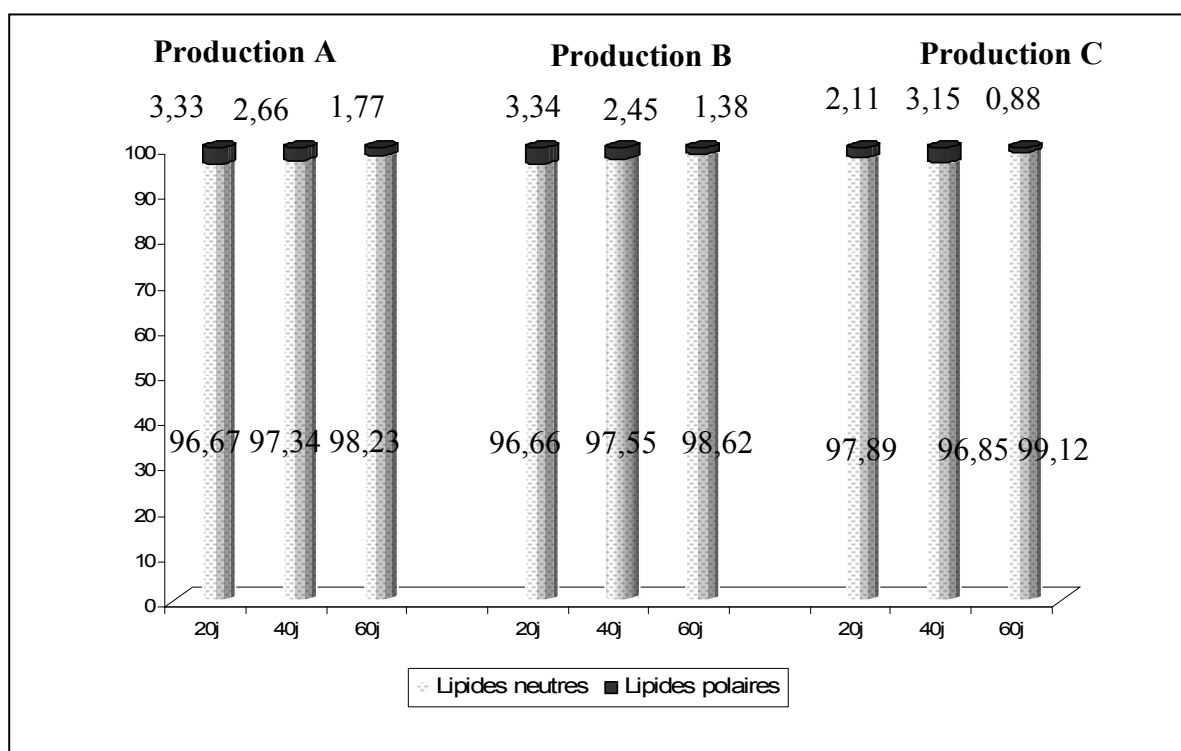


Figure 15. Proportions de lipides neutres et polaires (%) de la matière grasse du *Darfiyeh* extraite par Folch *et al.* (1957), pour trois lots de production (A, B et C), après 20, 40 et 60 j d'affinage; LN : lipides neutres, LP : lipides polaires

Cette diminution de la proportion des lipides polaires peut s'expliquer par l'augmentation relative du taux de lipides neutres (triacylglycérols et acides gras libres) avec le temps d'affinage (voir section 5.2.2) et surtout celle des acides gras libres, indicateurs de la lipolyse de la matière grasse au cours de l'affinage de la plupart des fromages (Perotti *et al.*, 2005 ; Yadav *et al.*, 2007).

De plus, les lipides polaires notamment les phospholipides se rencontrent dans toutes les cellules vivantes car ils sont des constituants indispensables des membranes biologiques. L'autolyse des bactéries lactiques se traduisant par la libération des enzymes intracellulaires (en particulier depeptidases) au cours de l'affinage des fromages, est susceptible de conduire à une intensification du développement de l'arôme du fromage (Kawabata *et al.*, 1997).

4.1.3.2 Indice d'acide et composition en acides gras

Traditionnellement, la discussion sur la lipolyse des fromages est basée sur la mesure des concentrations des acides gras libres (qui sont une indication du degré de la lipolyse) à une période déterminée de l'affinage. Dans le cas de notre étude, les acides gras libres n'ont pas été séparés des triacylglycérols, et les esters d'acides gras méthylés obtenus par la méthode de tri fluorure de bore avec du méthanol sont donc une indication du mélange formé par les acides gras libres et les acylglycérols.

Les valeurs de l'indice d'acide de la matière grasse augmentent progressivement jusqu'à 60 jours d'affinage (**Tableau 19**). Des différences significatives ($p < 0,05$) sont observées au niveau de la période d'affinage et non entre les trois lots de production A, B et C ($p > 0,05$). A 60 jours, les valeurs moyennes finales de l'indice d'acide varient entre 5,61 et 5,98 mg KOH.g⁻¹ matière grasse. Des résultats similaires ont été observés pour le fromage *Tulum* Turc fabriqué à partir de lait cru de chèvre (Yilmaz *et al.*, 2005).

Les résultats montrent que le *Darfiyeh* subit une légère lipolyse au cours de l'affinage. La dégradation des lipides dans les fromages pendant l'affinage est catalysée par la LPL (lipoprotéine lipase indigène du lait) et par les lipases microbiennes. La LPL est active à des pH entre 8,0 et 9,0 et à des températures entre 35 et 40 °C et elle est inhibée par du NaCl (Vlaemynck, 1992). Les valeurs de ces paramètres dans le fromage *Darfiyeh* sont donc loin des conditions optimales de la LPL.

La combinaison d'un pH bas et d'un taux élevé de sel, des conditions observées dans le *Darfiyeh* au cours de l'affinage, sont des facteurs inhibiteurs de la lipolyse liée au développement microbien (Downey, 1980).

Les acides gras sont des éléments essentiels au développement des arômes des fromages. Les différences dans les proportions en acides gras sont responsables du développement des arômes dans les différentes variétés de fromages (Califano et Bevillacqua, 2000).

La composition en acides gras exprimés en pourcentage des lipides totaux du *Darfiyeh* est présentée dans le **Tableau 19**.

Tableau 19. Composition en acides gras (%) des lipides totaux du *Darfiyeh*^x extraits selon la méthode Soxhlet (AOAC, 1990) jusqu'à 60 jours d'affinage, n=3

	20 jours			40 jours			60 jours		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Indice d'acide ^y	3,17±0,26 ^a	3,45±0,13 ^a	3,36±0,00 ^a	4,86±0,26 ^b	4,30±0,13 ^b	5,61±0,22 ^c	5,61±0,45 ^c	5,70±0,13 ^c	5,98±0,52 ^c
C6:0	3,35±0,24 ^b	3,66±0,34 ^b	0,99±0,16 ^a	3,54±0,55 ^b	4,91±0,84 ^c	1,01±0,29 ^a	4,01±0,39 ^b	4,10±0,06 ^{bc}	1,06±0,18 ^a
C8:0	3,90±0,19 ^b	4,23±0,39 ^{bc}	2,18±0,02 ^a	4,20±0,51 ^{bc}	5,43±0,71 ^d	2,14±0,21 ^a	4,76±0,29 ^{cd}	4,66±0,05 ^c	2,06±0,14 ^a
C10:0	12,18±0,69 ^b	12,89±0,77 ^{bc}	8,51±0,39 ^a	13,40±1,25 ^{bcd}	15,81±1,57 ^c	8,50±0,53 ^a	14,89±0,61 ^{de}	14,06±0,27 ^{cd}	8,15±0,17 ^a
C12:0	4,47±0,21 ^{bc}	4,37±0,19 ^b	3,33±0,15 ^a	4,94±0,25 ^{cd}	5,01±0,48 ^d	3,62±0,24 ^a	5,05±0,09 ^d	4,59±0,1 ^{bcd}	3,54±0,07 ^a
C14:0	10,22±0,29 ^{ab}	10,84±0,27 ^{abc}	10,09±0,30 ^{ab}	10,79±0,18 ^{abc}	11,85±1,41 ^c	10,83±0,54 ^{abc}	11,11±0,20 ^{bc}	10,87±0,09 ^{abc}	9,75±0,09 ^a
C16:0	25,72±0,15	26,16±0,71	29,35±0,60	25,93±0,89	27,60±3,79	28,94±0,34	26,09±0,49	25,40±0,27	27,91±0,29
C18:0	15,18±0,68 ^b	13,41±0,53 ^a	18,26±0,45 ^c	13,95±0,54 ^{ab}	13,68±1,87 ^{ab}	18,28±0,98 ^c	12,72±0,31 ^a	12,73±0,15 ^a	17,48±0,39 ^c
C18:1	20,99±0,67 ^{bcd}	20,81±0,56 ^{bcd}	22,67±1,82 ^{bcd}	19,47±1,15 ^{bc}	12,97±7,76 ^a	24,46±1,03 ^{cd}	17,82±0,61 ^{ab}	19,08±0,27 ^{bc}	25,47±0,58 ^d
C18:2	2,04±0,14 ^{abc}	1,79±0,08 ^{abc}	2,42±0,31 ^{bc}	1,96±0,08 ^{abc}	1,41±0,30 ^a	1,52±0,65 ^a	1,90±0,14 ^{abc}	1,76±0,02 ^{ab}	2,48±0,52 ^c
C18:3	1,05±0,04 ^b	0,91±0,04 ^{ab}	2,17±0,05 ^c	0,95±0,04 ^b	0,89±0,11 ^{ab}	0,70±0,28 ^a	0,90±0,00 ^{ab}	0,83±0,02 ^{ab}	2,09±0,05 ^c

^xTrois lots de production de *Darfiyeh* (A, B et C) à intervalles de 20 jours, n = nombre de répétitions,

^yIndice d'acide exprimé en mg KOH. g⁻¹ matière grasse,

^{a, b} les valeurs moyennes dans le même rang avec des exposants différents sont significativement différents ($p < 0,05$)

La teneur en acides gras à courtes chaînes a un impact significatif sur le développement des arômes caractéristiques du *Darfiyeh*. Le pourcentage de ce groupe d'acides gras (C6:0-C8:0) augmente légèrement au cours de l'affinage pour les deux lots A et B, mais demeure approximativement constant pour le lot C (**Figure 16**). Les acides gras à courtes chaînes représentent approximativement 8,77 %, 8,68 % et 3,12 % du total des acides gras, ceci pour les trois lots A, B et C à 60 jours d'affinage.

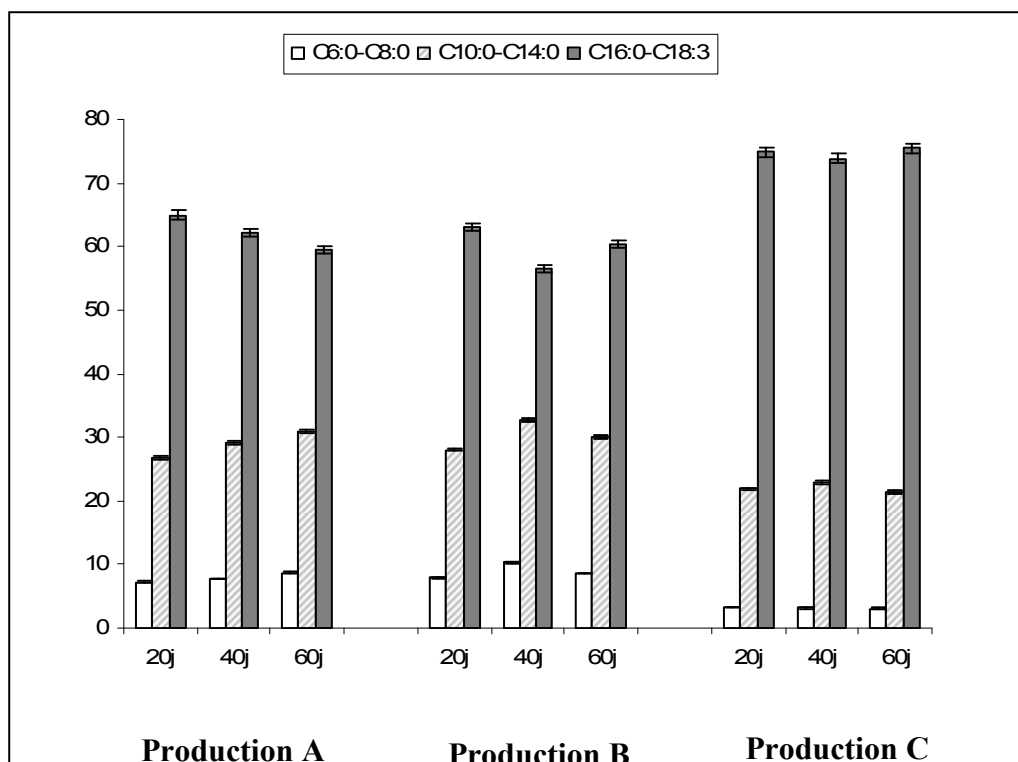


Figure 16. Pourcentages des acides gras à chaînes courtes (C6:0-C8:0), moyennes (C10:0-C14:0) et longues (C16:0-C18:3) pour trois lots de production de *Darfiyeh* (A, B et C), après 20, 40 et 60 jours d'affinage; j : jours

La proportion des acides gras à chaînes moyennes (C10:0-C14:0) augmente entre 20 et 60 jours d'affinage et représente approximativement 31,04 % et 30,13 % du total des acides gras pour les lots A et B, contre seulement 21,44 % pour le lot C, qui demeure cependant à un pourcentage relativement élevé.

Les acides gras à longues chaînes (C16:0-C18:3) constituent le groupe dominant. Les pourcentages de ce groupe d'acides gras pour les lots A et B représentent respectivement 62,22 % et 60,01 % du total contre des valeurs atteignant 75 % pour le lot C à 60 jours d'affinage.

Les pourcentages des acides C6:0, C8:0, C10:0 et C12:0 pour les lots A et B sont significativement plus élevées ($p < 0,05$) que pour le lot C au cours de l'affinage. Cette tendance reflète une activité lipolytique faible pour le lot C. Des teneurs plus faibles du groupe des acides gras à courtes chaînes ont été observées pour le fromage *Domati* au cours de l'avancement du stade de lactation (Soryal *et al.*, 2004). L'un des aspects les plus intéressants du lait des petits ruminants est la nature de leur matière grasse. Les laits de chèvre et de brebis ont une matière grasse riche en triacylglycérols à chaînes moyennes (6 à 10 atomes de carbone). Les acides caproïque, caprylique et caprique sont considérés comme caractéristiques des laits des petits

ruminants. L'acide caprique (C10:0) est l'acide gras principal de ce groupe. Nos résultats sont concordants avec ceux rapportés pour le fromage *Babia-Laciana* (Franco *et al.*, 2003).

Les valeurs moyennes de l'acide myristique (C14:0) pour les lots A, B et C sont respectivement de 11,11 %, 10,87 % et 9,75 % du total des acides gras identifiés à 60 jours d'affinage.

Les pourcentages des acides gras à longues chaînes pour les trois lots sont supérieurs à ceux des acides gras à chaînes moyennes. L'acide palmitique (C16:0) est l'acide gras majeur (~ 25-27 % du total) et n'a pas changé significativement ($p > 0,05$) au niveau de la production et de l'affinage. Les proportions des acides stéarique (C18:0) et oléique (C18:1) pour les lots A et B à 60 jours d'affinage sont respectivement de 12,72 %, 17,82 % et 12,73 %, 19,08 %, contre 17,48 %, 25,47 % pour le lot C. Les acides palmitique et oléique sont les acides gras dominants dans toutes les variétés de fromages (Najera *et al.*, 1993). A part leur importance quantitative, ces acides gras ne contribuent pas à la flaveur des fromages, comme c'est le cas des acides gras à chaînes courtes, mais ils affectent notamment le corps et la texture du fromage.

Ce groupe d'acides gras (C16:0, C18:0, C18:1) est le plus abondant au cours de l'affinage des fromages, comme dans le *Teleme* fabriqué à partir d'un mélange de lait de chèvre et de brebis (Mallatou *et al.*, 2003) et de la *Feta* traditionnelle à partir d'un mélange de lait de chèvre et de brebis (Georgala *et al.*, 2005). Les acides gras suivants (C10:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1) représentent plus de 75 % du total des acides gras des laits de chèvre et de brebis (Park *et al.*, 2007).

A noter que le degré de lipolyse varie considérablement entre les différentes variétés de fromages. Ainsi, les fromages de chèvre (De la Fuente *et al.*, 1993) et les fromages Danois (Walstra *et al.*, 1993) ont des activités lipolytiques faibles. Cependant, la lipolyse dans les fromages bleus et des fromages Italiens à pâte dure (Gripon, 1993) est intense et essentielle au développement des arômes. La lipolyse peut aussi affecter négativement la flaveur des fromages (goût rance) par la production d'une quantité importante d'acides gras libérés par l'action de la LPL (Grappin et Beuvier, 1997).

Au cours de l'affinage du *Darfiyeh*, la lipolyse pourrait être due à la libération de la LPL qui demeure toujours active dans le lait cru. Les lipases d'origine microbienne dérivent essentiellement des bactéries présentes dans le fromage et qui possèdent une activité lipolytique.

L'effet inhibiteur des sels (comme le NaCl) sur la lipolyse du fromage *Manchego* a été étudié (Pavia *et al.*, 2000). Cette observation est à rappeler à propos de l'affinage des trois lots de production A, B et C du *Darfiyeh*, où l'on a vu que les taux de NaCl diffèrent fortement.

Les conditions particulières de production du *Darfiyeh* (présure artisanale à forte activité lipolytique non utilisée) et celles de l'affinage (10-12 °C) ne favorisent pas une activité lipolytique intense. Cependant, le degré de lipolyse du lot C est nettement plus léger comparé à celui des lots A et B. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que les acides gras à courte chaîne du lot C, après avoir été libérés des triacylglycérols, subissent d'autres transformations comme la volatilisation et l'estérification, alors que les acides gras à moyennes et longues chaînes sont beaucoup moins réactifs. De plus, le stade de lactation et le niveau initial de lipolyse dans les laits de chèvre destinés à la fabrication du *Darfiyeh* ne sont pas négligeables.

Le profil des esters d'acides gras méthylés obtenus par la méthode de tri fluorure de bore pour le *Darfiyeh* issu du lot de production A à 40 jours d'affinage est illustré dans la **Figure 17** ci-dessous.

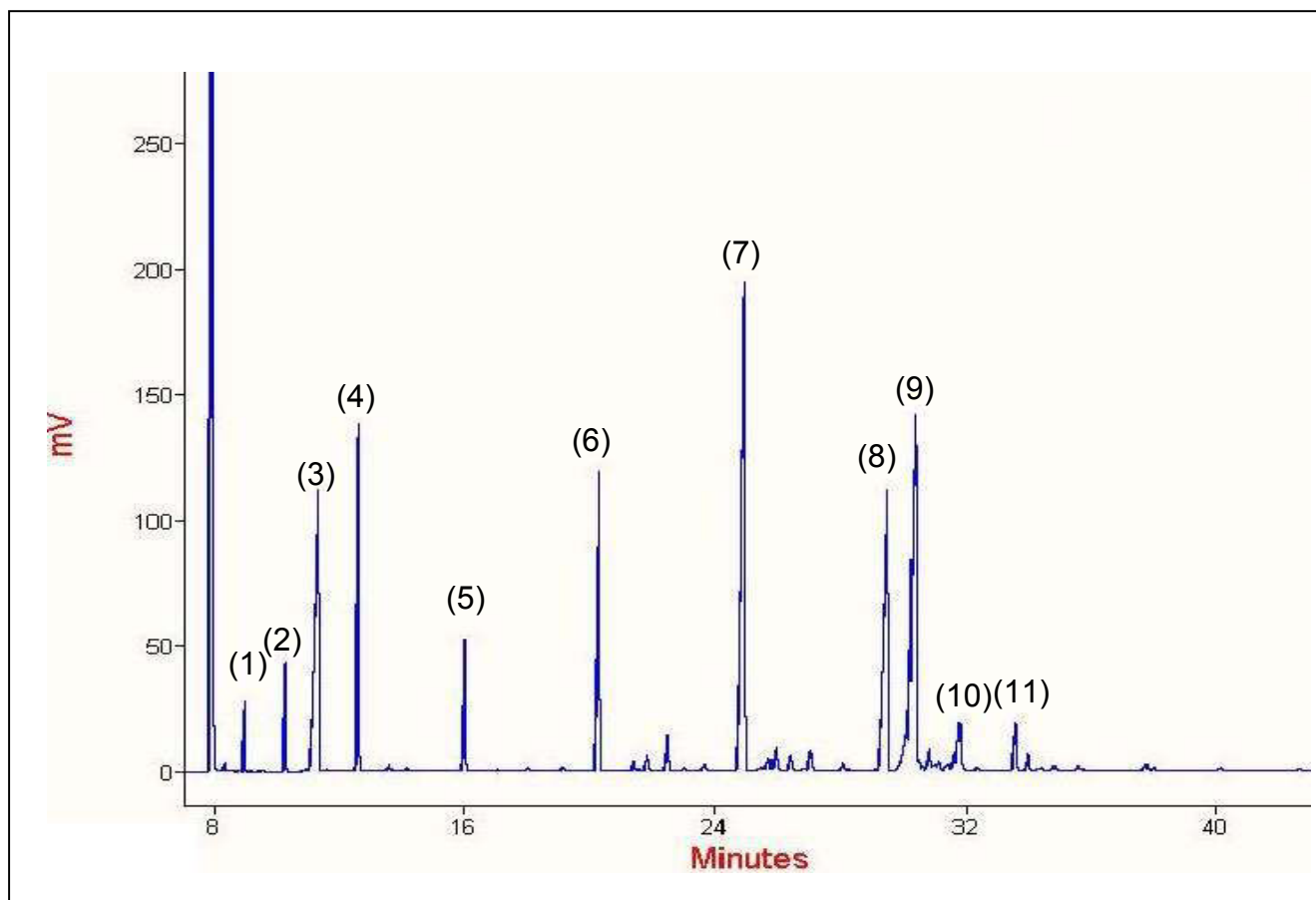


Figure 17. Chromatogramme type du profil des acides gras (%) des lipides totaux du *Darfiyeh* extraits selon la méthode Soxhlet (AOAC, 1990), *production A* à 40 jours d'affinage

Les pics identifiés sont : (1) C_{6:0}, (2) C_{8:0}, (3) C_{9:0} étalon interne, (4) C_{10:0}, (5) C_{12:0}, (6) C_{14:0}, (7) C_{16:0}, (8) C_{18:0}, (9) C_{18:1}, (10) C_{18:2}, (11) C_{18:3}

4.1.4 Composés volatils du *Darfiyeh* au cours de l'affinage

4.1.4.1 Caractéristiques des molécules volatiles standard

Les caractéristiques des molécules volatiles standard (point d'ébullition et temps de rétention) sont illustrées en **annexe 5**. Le chromatogramme des molécules volatiles standard est montré en **Figure 18** ci-dessous.

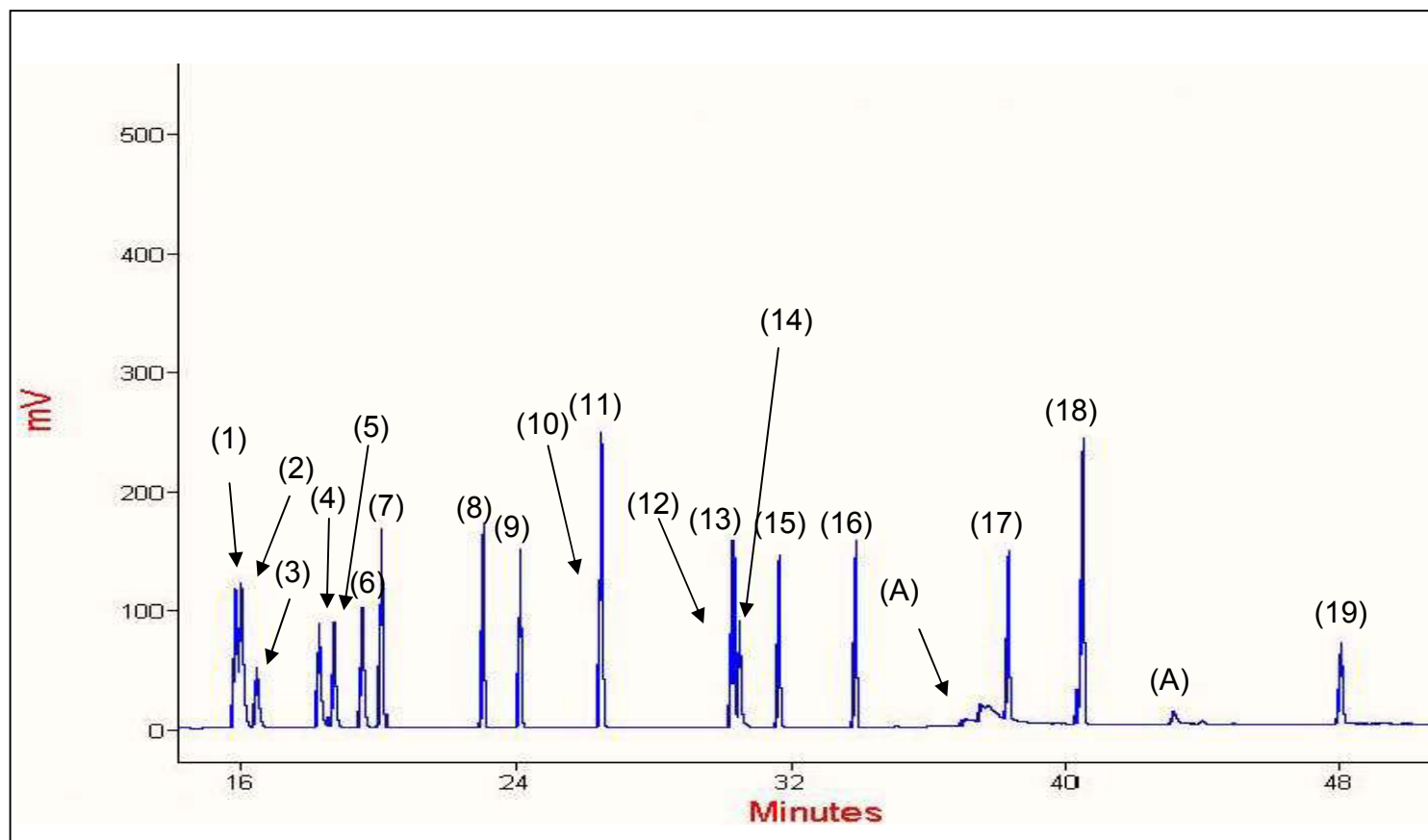


Figure 18. Chromatogramme du mélange des différents standard des composés volatils (à raison de 5 μL de chaque) fournis par Sigma[®]

Les pics identifiés sont : (1) 2-butanone, (2) 2-propanol, (3) 3-méthyl butanal, (4) 2,3-butanedione, (5) 2-pentanone, (6) 2-butanol, (7) 1-propanol, (8) 2-pentanol, (9) 1-butanol, (10) 3-méthyl butanol, (11) 2-heptanone, (12) 2-octanone, (13) 2-heptanol, (14) Octanal, (15) 1-hexanol, (16) 2-nonanone, (17) 1-octanol, (18) 2-undecanone, (19) 1-phényl éthanol, (A) artefact

4.1.4.2 Evolution des composés volatils

La méthode SPME a été utilisée pour extraire les composés volatils du *Darfiyeh* au moyen d'une fibre constituée d'un film de divinylbenzène/carboxen/polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) à 20, 40 et 60 jours d'affinage.

En comparant les deux méthodes d'extraction des composés volatils, celle de SPME et celle de *Purg and Trap* pour trois fromages Européens avec des dénominations d'origine : le *Gruyère*, le *Manchego* et le *Ragusano*, il s'est avéré que la méthode SPME est plus efficace pour l'extraction des composés volatils avec des points d'ébullition moyens et élevés, alors que la méthode *Purg and Trap* est plus efficace pour l'extraction des composés très volatils (point d'ébullition faible) (Mallia *et al.*, 2005). Les taux de matière grasse et de protéines, le pH et le taux d'humidité d'une matrice complexe comme le fromage ont des effets significatifs sur le degré d'adsorption de composés volatils (Conrad Frank *et al.*, 2004).

La phase solide de la fibre constituée d'un film de DVB/CAR/PDMS, est la meilleure pour adsorber les composés volatils et semi-volatils en comparaison avec les films de carboxen/polydiméthylsiloxane (CAR/PDMS) et polydiméthylsiloxane/divinylbenzène (PDMS/DVB), plus efficaces pour l'adsorption des composés volatils de faible poids moléculaire (Pillonnel *et al.*, 2002). Les fromages *Serra da Estrela* (Tavaria *et al.*, 2004) et *Terrincho* à base de lait de brebis (Pinho *et al.*, 2003) ont montré des profils aromatiques plus complets avec la fibre (DVB/CAR/PDMS).

Le chromatogramme type du *Darfiyeh* issu du lot A à 60 jours d'affinage est montré en **Figure 19**.

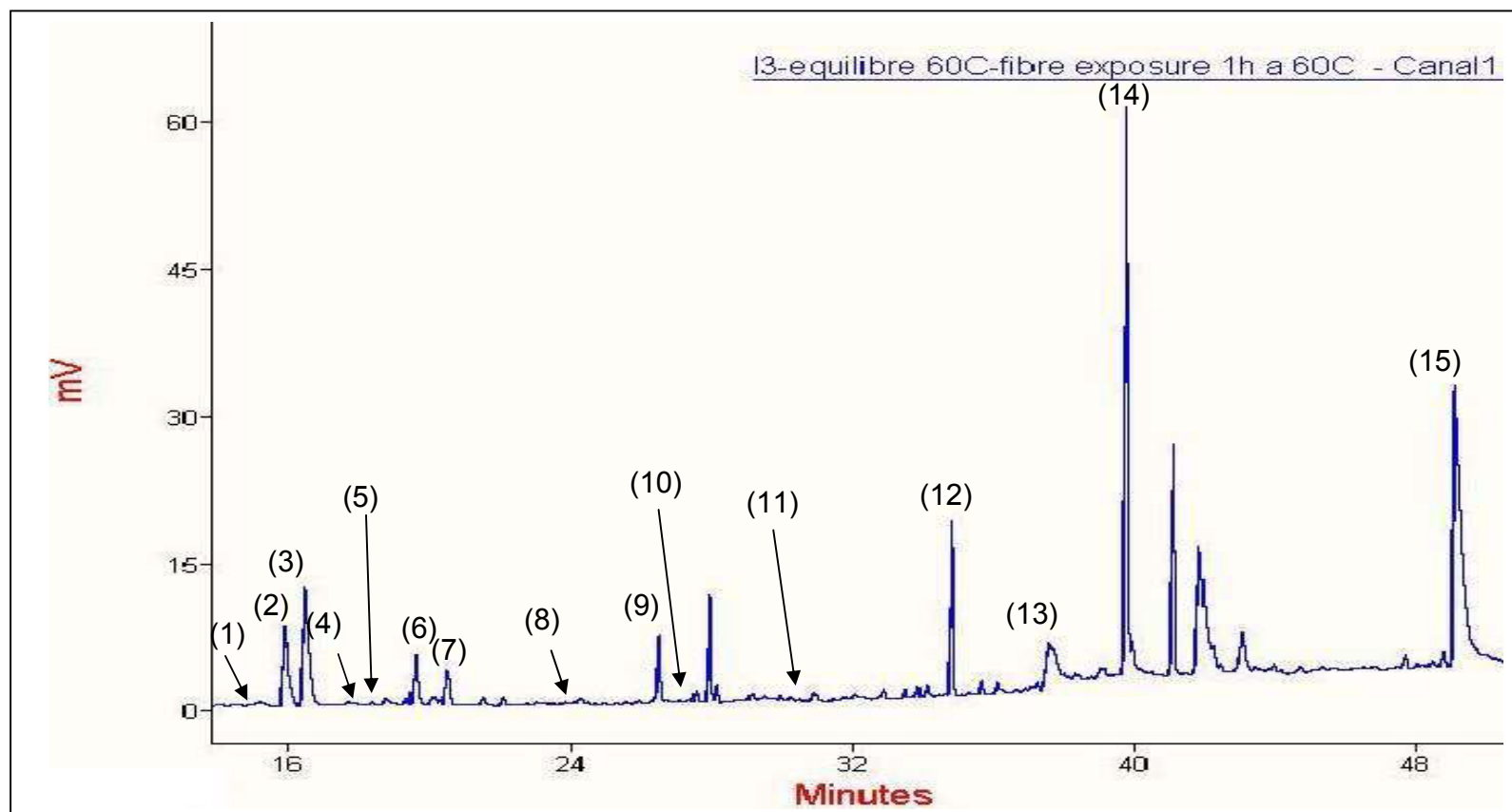


Figure 19. Chromatogramme type des composés volatils du fromage *Darfiyeh*, production A à 60 jours d'affinage

Les pics identifiés sont : (1) 2-butanone, (2) 2-propanol, (3) 3-méthyl butanal, (4) 2,3-butanedione, (5) 2-pentanone, (6) 2-butanol, (7) 1-propanol, (8) 1-butanol, (9) 3 méthyl butanol, (10) 2-heptanone, (11) Octanal, (12) 2-nonanone, (13) 1-octanol, (14) 2-undecanone, (15) 1-phényl éthanol.

Les pics non numérotés sont non identifiés

L'étude de la fraction volatile du *Darfiyeh* montre la présence de 16 composés volatils : 2 aldéhydes, 8 alcools et 6 cétones (**Tableau 20**). Il est remarquable que les alcools et les aldéhydes, avec leurs pourcentages élevés, soient les participants essentiels au profil aromatique du *Darfiyeh*. Ces deux groupes de volatils reflètent des notes florales, de fruité, du sucré et de l'alcool (Marilley et Casey, 2004). La plupart des composés de la fraction volatile ont tendance à augmenter au cours de l'affinage. Cependant, le 1-butanol et le 3 méthyl butanol ont tendance à diminuer. La diminution du 3-méthyl butanol est en concordance les travaux de Larrayoz *et al.* (2001) et de Castillo *et al.* (2007).

4.1.4.2.1 Les aldéhydes

Les aldéhydes sont les produits de l'auto-oxydation des acides gras insaturés ; l'auto- oxydation débute avec la formation des hydro peroxydes qui se dégradent par la suite en composés hydrocarbonés et carbonylés, comme ils pourraient aussi dériver des acides aminés pendant l'affinage. Les aldéhydes sont présents abondamment dans la fraction volatile des fromages *Fontina Valle d'Aosta* (Berard *et al.*, 2007) et *Majorero* (Castillo *et al.*, 2007). Ils sont considérés comme composés aromatiques clés dans quelques variétés de fromages (Bosset et Gauch, 1993). Les aldéhydes ne s'accumulent pas dans les fromages car ils sont rapidement convertis en alcools ou en acide correspondant.

L'octanal et le 3-méthyl butanal sont les deux aldéhydes identifiés dans la fraction volatile du *Darfiyeh*. Le 3-méthyl butanal avec les pourcentages les plus élevés pour le lot C au cours de l'affinage (45,14 %, 52,68 %, 50,20 %), justifie ainsi son rôle essentiel dans la formation des arômes caractéristiques du *Darfiyeh*. Le 3-méthyl butanal résulte du catabolisme de la leucine, et pourrait être oxydé soit en l'acide correspondant, soit réduit en l'alcool correspondant (3-méthyl butanol). Il est responsable de l'odeur de malt, d'huile et de beurre alors que l'octanal est responsable de l'odeur de vert et d'herbe (Panseri *et al.*, 2008). Il contribue considérablement à l'arôme des fromages grâce à ses propriétés de synergie avec les alcools (Seuvre *et al.*, 2000).

4.1.4.2.2 Les alcools

Les alcools sont capables de former des esters avec les acides gras libres. Les alcools primaires peuvent être formés par le métabolisme du lactose ou par réduction des aldéhydes. Les alcools secondaires sont obtenus par réduction enzymatique des cétones correspondantes (Molimard et Spinnler, 1996). La teneur élevée en alcools est due à un environnement où le potentiel redox est bas et à la présence de réductases de la flore microbienne (Mallia *et al.*, 2005).

Parmi les alcools identifiés dans la fraction volatile du *Darfiyeh*, le 1-phenyl éthanol, le 1-octanol, le 3-méthyl butanol et le 1-propanol sont les plus abondants dans les trois lots de production A, B et C. Il est clair que les valeurs moyennes du 1-phényl éthanol sont les plus élevées. Aucune différence significative n'est signalée au niveau des lots de production, ni au niveau du stade d'affinage pour le 1-octanol et le 3-méthyl butanol ($p > 0,05$). Cependant ce dernier alcool primaire diminue légèrement au cours de l'affinage ($p < 0,05$). La présence de l'éthanol à des pourcentages élevés est probablement due à la microflore naturelle présente initialement dans le lait, notamment des levures, des *Leuconostocs* et des lactobacilles hétérofermentaires, susceptibles de produire de grandes quantités d'éthanol par fermentation du lactose (Axelsson, 1993) ; c'est le cas du fromage *Halloumi* (Kaminarides *et al.*, 2007). Les 1-phényl éthanol, 1-octanol, 3-méthyl butanol, avec le 1-butanol et le 1-propanol, sont détectés à des pourcentages élevés dans la fraction volatile d'autres fromages au lait cru (Carbonell *et al.*, 2002 ; Berard *et al.*, 2007). La fraction volatile des fromages au lait cru contient des pourcentages élevés en alcools ; la pasteurisation a un impact négatif sur la production d'alcools au cours de l'affinage.

La présence de 3-méthyl butanol est une conséquence du métabolisme des acides aminés, notamment la transamination et la décarboxylation de la leucine (Leveau et Bouix, 1993). Il a été rapporté que la diversité initiale de la flore influence l'abondance de quelques composés aromatiques comme le 3-méthyl butanol, surtout avec des taux élevés de *Lactococcus lactis* (Centeno *et al.*, 2002). De plus, comme la plupart des alcools résultent de l'activité de certains lactobacilles (Butzke *et al.*, 1992), la présence de 3-méthyl butanol peut être corrélée à la présence de lactobacilles (Randazzo *et al.*, 2008). Le 3-méthyl butanol est présent dans le fromage traditionnel Portuguais *Serra da Estrela* fabriqué à partir du lait de brebis cru et âgé de 6 semaines (Partidario *et al.*, 1998). En tant que descripteurs de l'odeur, le 1-phenyl éthanol est responsable de l'odeur de rose et de fleur (Conrand Frank *et al.*, 2004), le 3-méthyl butanol de l'odeur d'herbe et d'huile (Panseri *et al.*, 2008), et le 1 propanol de l'odeur de l'alcool et du sucré (Pinho *et al.*, 2003).

4.1.4.2.3 Les cétones

La concentration en cétones dans les fromages dépend de la quantité et de la composition de la matière grasse dans le lait destiné à la fabrication fromagère (Banks *et al.*, 1992). Leur présence est principalement due à l'activité lipolytique de la microflore du fromage. La formation des cétones est le résultat de l'oxydation enzymatique des acides gras libres et des β -cétoacides ; leur

réduction en alcools secondaires par les réductases bactériennes est considérée comme un mécanisme de défense des micro-organismes contre la toxicité (Molimard et Spinnler, 1996 ; McSweeney et Sousa, 2000). Elles sont responsables de la note aromatique des fromages à pâte molle et des fromages affinés avec des moisissures, mais on les trouve aussi dans la plupart des fromages affinés à pâte mi-dure et dure (Gomez-Ruiz *et al.*, 2002). Elles sont plus abondantes dans les fromages traditionnels fabriqués à échelle artisanale.

La 2-heptanone, la 2-nonanone et la 2-undécanone sont les cétones les plus abondantes dans la fraction volatile du *Darfiyeh*. Les valeurs moyennes de ce groupe de composés a tendance à augmenter au cours de l'affinage ($p < 0,05$). La 2-heptanone a été identifiée en proportion élevée dans la fraction volatile des fromages *Parmigiano* (Bellesia *et al.*, 2003) et *Fontina Valle d'Aosta* (Berard *et al.*, 2007). Les fromages *Provola dei Nebrodi* (Ziino *et al.*, 2005) et *Bitto* (Panseri *et al.*, 2008) contiennent des pourcentages élevés en 2-nonanone et 2-heptanone.

Le diacétyl (2,3-butanedione) est aussi présent dans le *Darfiyeh*. Il est métabolisé par activité bactérienne en 2-butanone et 2-butanol (Urbach, 1993) qui sont présents dans la fraction volatile du *Darfiyeh*, justifiant ainsi la présence des bactéries "non levains" (Mallatou *et al.*, 2005 ; Berard *et al.*, 2007). La 2-heptanone, la 2-nonanone et le diacétyl sont considérés comme les arômes typiques du beurre. La 2-undécanone est responsable de l'odeur de citron, de rose et d'iris ; la 2-pentanone de l'odeur de fleur et de l'éther et la 2-butanone de l'odeur de l'acétone (Panseri *et al.*, 2008).

Tableau 20. Composés volatils identifiés (%) dans le fromage *Darfiyeh*^x jusqu'à 60 jours d'affinage, n=3

Composé volatil	20 jours			40 jours			60 jours		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>Aldéhydes</i>									
3-méthyl butanal	34,75±3,60 ^{bc}	2,28±1,47 ^a	45,14±2,06 ^{de}	29,49±7,85 ^b	28,11±2,24 ^b	52,68±2,97 ^e	6,92±1,74 ^a	41,81±3,72 ^{cd}	50,20±3,64 ^e
Octanal	nd	0,81±0,18 ^{ab}	0,70±0,13 ^{ab}	0,96±0,11 ^{ab}	1,39±0,57 ^b	nd	1,50±0,80 ^b	nd	1,02±0,53 ^b
<i>Alcools</i>									
2-propanol	<0,1	14,76±6,31 ^c	nd	0,02±0,00 ^a	nd	nd	5,66±1,47 ^b	nd	nd
2-butanol	0,12±0,00 ^a	1,54±0,62 ^{bd}	nd	nd	0,17±0,05 ^a	nd	2,18±0,00 ^c	nd	nd
1-propanol	1,37±0,56	2,03±0,64	1,64±0,16	1,41±0,33	1,87±0,28	1,54±0,46	1,57±0,46	1,36±0,18	1,60±0,09
2-pentanol	2,15±2,46	0,54±0,23	<0,1	0,23±0,08	0,22±0,02	0,06±0,01	0,29±0,10	0,10±0,00	nd
1-butanol	0,77±0,70	0,58±0,18	0,18±0,02	0,43±0,12	0,17±0,01	0,24±0,02	0,18±0,03	0,14±0,01	0,18±0,02
3 méthyl butanol	6,04±5,46	5,50±2,32	2,24±0,20	4,95±0,33	3,00±0,32	2,19±0,13	2,67±0,38	1,49±0,25	1,84±0,03
1-octanol	5,37±0,40	10,12±14,43	12,03±3,16	21,17±11,23	7,95±2,06	5,26±1,21	5,94±0,49	13,48±1,52	7,68±4,26
1-phényl éthanol	15,66±10,07 ^a	16,13±6,2 ^a	17,23±0,98 ^a	16,38±2,83 ^a	28,66±2,00 ^{cd}	13,33±1,89 ^a	27,91±1,38 ^{bd}	17,23±1,46 ^a	14,56±1,20 ^a
<i>Cétones</i>									
2-butanone	0,67±0,15	<0,1	0,16±0,11	0,29±0,37	0,17±0,05	0,31±0,05	0,23±0,20	0,23±0,06	0,28±0,04
2,3-butanedione	<0,1	0,20±0,08 ^{cf}	nd	0,21±0,07 ^{df}	0,15±0,05 ^{bef}	nd	0,12±0,01 ^{aef}	nd	nd
2-pentanone	<0,1	0,56±0,14 ^b	nd	0,24±0,09 ^a	nd	nd	0,30±0,10 ^a	<0,1	nd
2-heptanone	3,45±2,65	1,25±0,37	3,12±0,20	0,81±0,11	3,68±0,75	3,57±0,52	2,61±0,73	2,35±0,16	3,80±0,45
2-nonanone	1,09±0,56 ^{ab}	1,05±0,42 ^{ab}	2,15±0,12 ^{cd}	0,74±0,13 ^a	1,86±0,43 ^{bc}	2,76±0,20 ^d	4,94±0,53 ^e	2,42±0,49 ^{cd}	2,52±0,30 ^{cd}
2-undecanone	1,80±0,33 ^a	1,20±0,41 ^a	3,41±1,61 ^b	1,15±0,29 ^a	1,22±0,25 ^a	5,66±0,41 ^c	7,97±0,61 ^d	5,70±1,48 ^c	4,24±0,08 ^b

^xTrois lots de production de *Darfiyeh* (A, B et C) à intervalles de 20 jours,

n = nombre de répétitions, nd = non déterminé,

^{a, b} les valeurs moyennes dans le même rang avec des exposants différents sont significativement différents ($p < 0,05$)

4.1.5 Conclusion

Les conclusions partielles que l'on peut tirer de cette étude sont rassemblées ci-dessous :

- *Le Darfiyeh est un fromage de chèvre à pâte mi-dure (moyenne de la teneur sèche à 60 j est de 47,83 %) ;*
- *Le Darfiyeh est caractérisé par une protéolyse modérée, traduite par une augmentation significative des valeurs de l'ANC et de l'ANP au cours de l'affinage ;*
- *Le Darfiyeh subit également une lipolyse modérée ;*
- *Les acides gras à courte et longue chaîne semblent contribuer à une différenciation nette entre les divers lots de production qui évoluent de façon non uniforme au cours de l'affinage ;*
- *Pour ce qui est fraction volatile, deux aldéhydes, huit alcools et six cétones ont été identifiés ; le 3 méthyl butanal, le 1-phényl éthanol et le 1-octanol sont les composés clés qui pourraient être responsables de l'arôme caractéristique du Darfiyeh.*

Cette étude est une première approche de la caractérisation du *Darfiyeh* au cours de l'affinage. Si ce fromage doit être qualifié d'une dénomination d'origine, les laits de chèvre destinés à sa fabrication doivent être standardisés, puis la fabrication et l'affinage doivent être soumis à de nombreux contrôles. Par ailleurs, la production du *Darfiyeh* pourrait être planifiée selon les saisons. Enfin, les travaux de recherche doivent être poursuivis et étendus.

4.2 Caractérisation microbiologique du fromage *Darfiyeh*

4.2.1 Introduction

La caractérisation microbiologique du fromage *Darfiyeh* a pour objectif de préserver son patrimoine microbien, que ce soit pour la constitution d'une collection de souches ou pour le maintien de la diversité écologique propre au terroir du *Darfiyeh*.

La signature microbienne d'un fromage ne provient pas d'espèces spécifiques mais d'un ensemble de souches appartenant à plusieurs espèces et présentes à des niveaux différents. Dans ce contexte, l'étude du *Darfiyeh* a débuté dans un premier temps par l'évolution de la proportion des flores bactériennes au cours de l'affinage.

De plus, dans un second temps, nous avons choisi d'identifier les bactéries lactiques présentes dans le *Darfiyeh*. Deux approches furent appliquées ; la première approche consiste en une culture des micro-organismes sur des milieux sélectifs, suivie d'une identification au niveau du genre et/ou de l'espèce. La deuxième approche, complémentaire de la première, est l'analyse des fragments d'ADN extraits des souches bactériennes contenues dans le fromage au moyen de techniques de la biologie moléculaire, sans culture préalable. A cet effet, une image globale et dynamique des communautés bactériennes du fromage *Darfiyeh* a été réalisée par la technique TTGE. De plus, les suivis de *S. thermophilus*, *E. faecium*, *E. durans* et *Lc. lactis* subsp. *lactis* furent réalisés par la PCR classique et la quantification de *S. thermophilus* et d' *E. faecium* par la PCR en temps réel.

4.2.2 Evolution des numérations bactériennes classiques au cours de l'affinage du *Darfiyeh*

Les numérations des différents groupes microbiens du *Darfiyeh* au cours de 60 j d'affinage sont présentées dans le **Tableau 21**.

Tableau 21. Numérations bactériennes (Log ufc.g⁻¹) des différents groupes microbiens pour trois lots de production de *Darfiyeh* (A, B et C)^x au cours de l'affinage (DS = 0,1)

Durée d'affinage (j)	MRS (30 °C pour 96 h) (Lactobacilles mésophiles)	MRS (42 °C pour 48 h) (Lactobacilles thermophiles)	M17 (42 °C pour 48 h) (BL thermophiles forme coque)	PCA (30 °C pour 72 h) (Flore aérobie mésophile)	MSA (37 °C pour 48 h) (Microcoques)
Lot de production A					
20	10,2 ^e	7,2 ^c	8,3 ^e	9,4 ^c	6,3
40	10,3 ^e	7,0 ^c	7,8 ^d	9,0 ^c	<1
60	10,4 ^e	7,1 ^c	8,4 ^f	9,1 ^c	<1
Lot de production B					
20	7,3 ^c	6,3 ^b	7,3 ^b	8,0 ^b	6,4
40	7,3 ^c	5,7 ^a	6,9 ^a	7,1 ^b	<1
60	7,2 ^{ab}	5,5 ^a	6,6 ^a	6,9 ^a	<1
Lot de production C					
20	7,4 ^d	5,5 ^a	7,4 ^{cd}	9,4 ^c	6,1
40	7,2 ^{bc}	6,1 ^b	6,6 ^a	8,6 ^{bc}	<1
60	7,1 ^a	6,0 ^b	7,3 ^{bc}	9,1 ^c	<1

^xA, B et C à intervalles de 20 j,^{a, b}les valeurs moyennes dans la même colonne avec des exposants différents sont significativement différents ($p < 0,05$),

DS : déviation standard ; BL : bactéries lactiques

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale cultivée sur milieu PCA est très élevé pour les trois lots de production, avec des valeurs maximales à 20 j d'affinage qui diminuent ensuite jusqu'à 60 j pour le lot B ($p < 0,05$). La période d'affinage n'a pas d'influence significative sur l'évolution de la flore aérobie mésophile au cours du temps pour les lots A et C ($p > 0,05$). Ces valeurs moyennes sont sensiblement inférieures à celles de la littérature pour d'autres fromages de chèvre à base de lait cru (Mas *et al.*, 2002), mais beaucoup plus élevées que celles d'autres fromages, comme le *Batzos* et le *Valdeteja* (Alonso-Calleja *et al.*, 2002).

Des niveaux de population élevés en bactéries lactiques thermophiles, cultivées sur milieu M17, sont observés dans le *Darfiyeh*. Les deux lots A et C présentent la même évolution, respectivement 8,3 ; 7,8 ; 8,4 et 7,4 ; 6,6 ; 7,3 après 20, 40 et 60 j, alors qu'une diminution progressive et continue est observée pour le lot B. Le fromage italien artisanal *Caprino*

d'Aspromonte, produit à partir du lait de chèvre cru, présente la même caractéristique que les échantillons A et C.

Pour les trois lots, les bâtonnets prédominent par rapport aux coques ; le dénombrement des lactobacilles mésophiles est plus élevé que celui des lactocoques thermophiles. Ceci reflète probablement l'effet simultané des taux élevés de NaCl et des valeurs basses de pH que les lactobacilles tolèrent davantage que les lactocoques (Sharpe, 1966). Les caractéristiques physico-chimiques particulières du *Darfiyeh*, valeurs de pH et taux de NaCl, soutiennent cette évolution (Serhan *et al.*, 2007).

Les numérations des lactobacilles mésophiles sont plus élevées que celles des lactobacilles thermophiles. Les lactobacilles constituent la majorité des bactéries lactiques 'non levains' (Non Starter Lactic Acid Bacteria) présentes dans la plupart des fromages (Mannu *et al.*, 2000b). Ils sont connus comme étant le seul groupe microbien qui pousse bien dans l'environnement "hostile" présent dans l'intérieur du fromage, un pH bas, des taux élevés de NaCl et des conditions d'anaérobiose (Marino *et al.*, 2003).

Les microcoques présentent des populations élevées jusqu'à 20 j d'affinage, diminuant d'environ 5 unités $\log_{10}$ jusqu'à 60 j d'affinage. Ceci est probablement en relation avec l'anaérobiose lors de d'affinage du *Darfiyeh* dans la peau de chèvre qui ne favorise pas la survie des microcoques qui sont aérobies. Un résultat similaire a été observé dans le fromage espagnol *Manchego*, fabriqué à partir du lait de chèvre cru à 30 j d'affinage (Cogan et Rea, 1996). Les microcoques ont été détectés dans la plupart des variétés de fromage comme étant un agent majeur de la flore secondaire (Manolopoulou *et al.*, 2003). De plus, les microcoques, sensibles à des pH acides, n'ont jamais été dominants. Il a été rapporté en particulier que les microcoques, dans les fromages, sont impliqués dans le métabolisme de la méthionine (Sable *et al.*, 1997), tout en étant des précurseurs de nombreux composés sulfurés qui participent à la note aromatique des fromages bleus (odeur d'ail). Cependant, le rôle des microcoques est limité lors de l'affinage du *Darfiyeh*.

4.2.3 Identification et caractérisation des isolats de bactéries lactiques issus du *Darfiyeh*

Il convient de rappeler que l'identification et la caractérisation des isolats de bactéries lactiques étaient effectuées, pour un lot unique de *Darfiyeh*, et non pour les trois lots A, B et C.

Parmi les 34 isolats de *Darfiyeh*, les lactobacilles et les entérocoques avec des niveaux d'isolement respectifs de 29,41 % et 38,23 %, sont les groupes dominants (**Figure 20**). Ces résultats qui sont typiques des fromages à pâte mi-dure sont comparables à ceux de fromages de chèvre artisanaux originaires d'Espagne (Fontecha *et al.*, 1990).

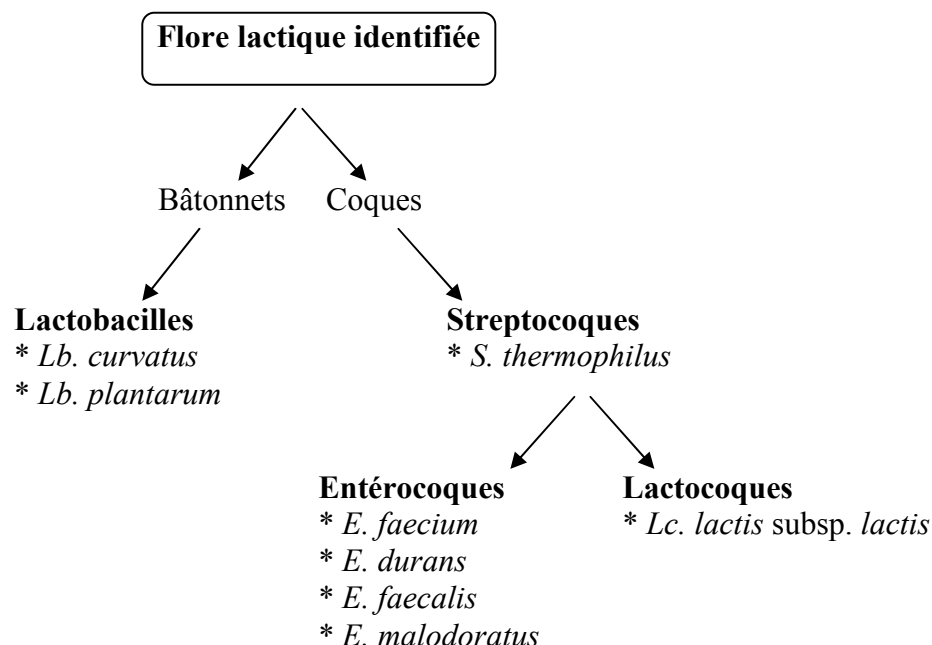


Figure 20. Différentes espèces de bactéries lactiques identifiées dans le fromage *Darfiyeh*

Parmi les streptocoques lactiques, *S. thermophilus* a été isolé. Un niveau d'isolement de 17,64 % (6 isolats) a été mis en évidence pour ce groupe microbien, qui a été mis en évidence à 14 % dans une étude visant à caractériser la flore lactique de 24 fromages artisanaux (Cogan *et al.*, 1997). *S. thermophilus* est le plus important second levain après *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Hols *et al.*, 2005). Il est associé dans les processus biochimiques au cours de l'affinage.

Parmi les bactéries lactiques en forme de bâtonnets, dix isolats appartiennent au genre *Lactobacillus* et plus précisément aux espèces *Lb. curvatus* et *Lb. plantarum*. Cette espèce est considérée comme étant le principal lactobacille qui caractérise l'environnement laitier. Il prédomine dans d'autres fromages de chèvre comme l'*Ibore* (Mas *et al.*, 2002) et le *Nostrano di Primiero* (Poznanski *et al.*, 2004). Ceci reflète la grande tolérance de *Lb. plantarum* aux sels et aux valeurs basses de pH qui sont des caractéristiques communes de ces fromages. *Lb. plantarum* participe à la maturation des fromages (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2007).

Parmi les entérocoques (13 isolats), *E. faecium*, *E. durans*, *E. faecalis* et *E. malodoratus* sont les principales espèces identifiées. Les entérocoques dérivent probablement de la contamination d'origine fécale du lait cru destiné à la fabrication fromagère. Cependant, ils ont été considérés comme étant des groupes microbiens résistant à des conditions défavorables, comme le sel, l'acidité, la contamination provenant de la présence d'animaux domestiques dans la ferme (Mundt, 1986). Ceci explique la prédominance des entérocoques dans les fromages de chèvre à base de lait cru comme le *Montasio* (Marino *et al.*, 2003) ; généralement, *E. faecium* et *E. faecalis* sont les espèces d'entérocoques les plus communément isolées de ces fromages, mais leurs proportions varient en fonction de la variété de fromage. Ils pourraient influencer l'affinage grâce à leurs activités protéolytiques et lipolytiques, et par leur capacité à stimuler la production d'acide par quelques lactocoques (Sarantinopoulos *et al.*, 2001).

Parmi les lactocoques (14,70 %), *Lc. lactis* subsp. *lactis* est la seule espèce identifiée (5 isolats). Cette espèce, fréquente dans les fromages au lait cru, est la seule espèce représentative du genre (Mas *et al.*, 2002). Ceci est en concordance avec les observations de Weerkamp *et al.* (1996) en ce qui concerne la prédominance de *Lc. lactis* subsp. *lactis* dans les fromages au lait cru et dans les produits naturellement fermentés.

4.2.4 Identification par PCR

4.2.4.1 PCR-TTGE

La TTGE est une excellente méthode pour décrire les espèces bactériennes dominantes dans un écosystème laitier. Cette méthode pourra être utilisée pour différencier les fromages selon leur technologie, leur origine ou leurs caractéristiques régionales. Les profils de TTGE pour les écosystèmes laitiers sont relativement simples (moins de dix bandes) par comparaison avec d'autres écosystèmes (sol, appareil digestif ...) (Ogier *et al.*, 2002).

Nos résultats montrent que l'écosystème bactérien du *Darfiyeh* n'est pas aussi riche, comme on pouvait l'attendre pour un fromage au lait cru (**Figure 21**). L'identification des bandes est réalisée par comparaison avec celles de souches pures isolées de *S. thermophilus*, *E. durans*, *E. faecium*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris*.

Indépendamment des espèces bactériennes présentes initialement dans le lait cru, le profil TTGE a confirmé la présence de bandes associées à de *S. thermophilus*, *E. durans*, *E. faecium*, *Lb.*

plantarum, *Lb. curvatus* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Les analyses de TTGE de huit fromages (*Camembert* fabriqué à partir de lait cru, *Camembert* fabriqué à partir de lait pasteurisé, *Brie*, *Emmental*, *Comté*, *Beaufort*, un fromage industriel (France), et un fromage artisanal frais (Ferme de Viltain, Jouy-en-Josas, France) ont montré différents profils comportant entre deux et huit bandes par produit ; à titre d'exemple, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides* sont les trois espèces bactériennes identifiées dans un fromage artisanal, alors que *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *S. thermophilus* sont les deux espèces identifiées dans le fromage *Brie*, après une courte période d'affinage (Ogier *et al.*, 2002).

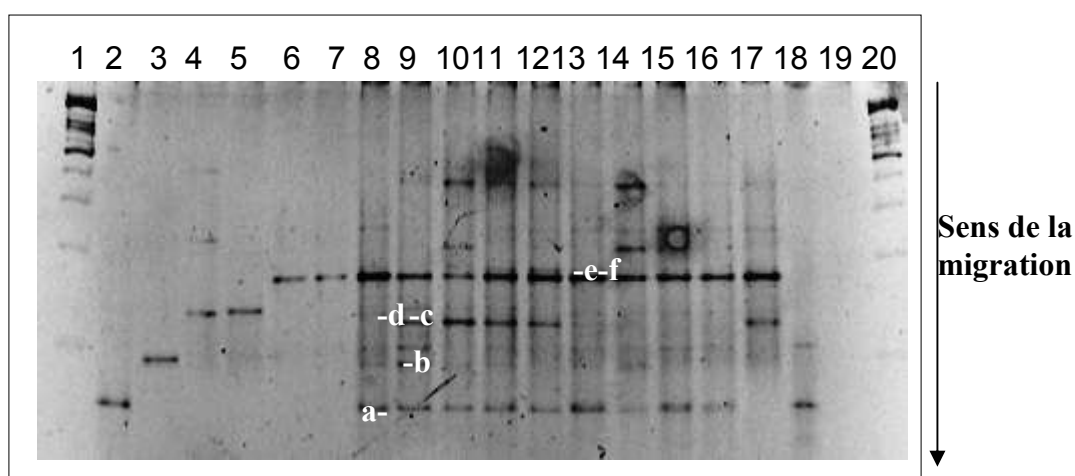


Figure 21. Résultats de la PCR-TTGE des fragments de la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S du *Darfiyeh* au cours de l'affinage, respectivement à partir de trois lots de productions A, B et C à intervalle de 20 j ;

1 : Marqueur de taille, 2 : *S. thermophilus* DSM 20617^T, 3 : *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363, 4 : *Lb. plantarum* DSM 20174^T, 5 : *Lb. curvatus* DSM 20019^T, 6 : *E. faecium* DSM 20477^T, 7 : *E. durans* CIP 55125^T, 8-10 : production A de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage, 11-13 : production B de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage, 14-16 : production C de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage, 17 : Echantillon *Darfiyeh* à J0 de production, 18 : Témoin H₂O (1^{er} contrôle négatif), 19 : Témoin H₂O (2^{ème} contrôle négatif).

Les bandes suivantes associées au *Darfiyeh* sont attribuées à : -a : *S. thermophilus*, -b : *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, -c : *Lb. plantarum*, -d : *Lb. curvatus*, -e : *E. faecium*, -f : *E. durans*.

Les analyses de TTGE ont été poursuivies au laboratoire, par le clonage des produits de PCR puis leur séquençage. La comparaison des séquences avec celles présentes dans les bases de données a permis de déterminer la présence des bactéries suivantes : *Staphylococcus haemolyticus*, *Clostridium bifermentans* ou *Eubacterium tenue* et *Escherichia coli*.

Les staphylocoques sont des bactéries commensales des mammifères ; ils sont une composante normale de la flore de la peau humaine et pourraient être responsables de plusieurs infections. Parmi les staphylocoques à coagulase négative, *S. haemolyticus* est classé en deuxième rang après *S. epidermidis* par rapport à sa fréquence d'isolement à partir des cultures de sang. *S.*

haemolyticus est moins virulent que *S. aureus* ; il pourrait causer des septicémies, des otites et des infections de l'appareil urinaire (Takeuchi *et al.*, 2005).

Clostridium bifermentans est isolé à partir du sol, de l'eau fraîche, des sédiments marins, des fèces humaines, de la flore cervicale normale, des fromages fondus et du poisson fumé emballé sous vide. Il a été décrit comme un pathogène de moustique. Il pourrait être responsable des ulcères de l'estomac et des abcès. Il a été associé à des malignités hématologiques et est capable de produire une enzyme, la 7-dehydroxylase (Scanlan *et al.*, 1994).

Le genre *Eubacterium* y compris *Eubacterium tenue* est plus commun que le genre *Bifidobacterium* dans l'appareil intestinal humain (Schwiertz *et al.*, 2000).

Escherichia coli colonise l'appareil intestinal des humains et des animaux à sang chaud. Plusieurs souches d' *E. coli* possèdent des gènes de virulence ; ils sont responsables de trois principales infections cliniques : diarrhée, infection de l'appareil urinaire et des méningites. Il a été isolé à partir des fromages traditionnels fabriqués au lait de brebis cru (Holko *et al.*, 2006).

4.2.4.2 Analyse de *S. thermophilus*

4.2.4.2.1 PCR classique

A une température de 60 °C, l'amplification d'une séquence nucléotidique du gène lac Z de *S. thermophilus* CNRZ440, donne une bande de 260 pb (Furet *et al.*, 2004). Avec *S. thermophilus* DSM 20617^T, les conditions de PCR ont été modifiées ; la température d'hybridation a été diminuée de 1 °C, de 60 à 55 °C. A une température de 55 °C, le couple d'amorces St1-St2 serait spécifique de cette espèce bactérienne. La recherche de *S. thermophilus* a été réalisée dans 9 échantillons de *Darfiyeh* (**Figure 22**). Les dix amplifiats par PCR des fromages *Darfiyeh* permettent d'observer une seule bande de 260 pb, résultat identique à celui de Furet *et al.* (2004). Les échantillons de *Darfiyeh*, à 20 j d'affinage dans les lots A (**Figure 22, bande 2**) et B (**Figure 22, bande 5**) et à J0 (**Figure 22, bande 11**) ne donnent aucune bande.

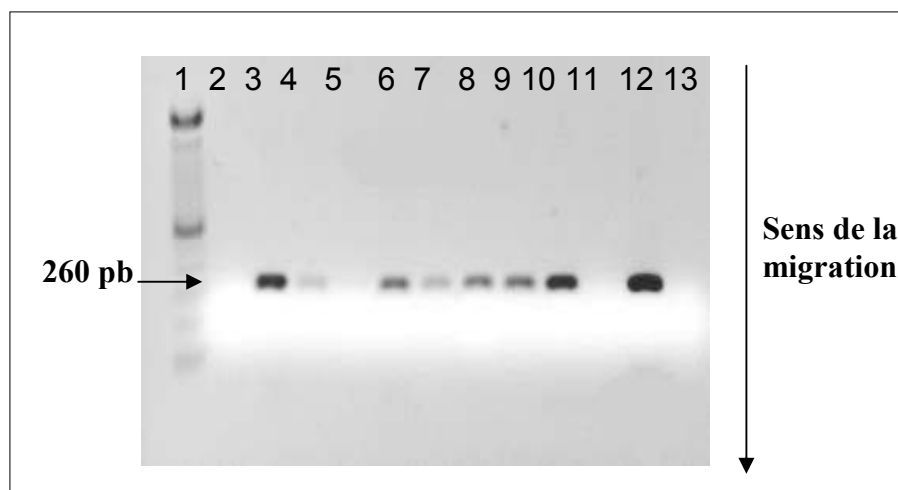


Figure 22. Résultats de la PCR avec le couple d'amorces St1-St2 pour la recherche de *S. thermophilus* dans le Darfiyeh,

1 : Marqueur de taille (Smart Ladder SF, de 100 à 1000 pb) ; 2-4 : production A de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage ; 5-7 : production B de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage ; 8-10 : production C de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage ; 11: Echantillon *Darfiyeh* à J0 de production ; 12 : contrôle positif ; 13 : contrôle négatif ; Température d'hybridation : 55 °C ; Essais réalisés en double

4.2.4.2.2 PCR en temps réel

Récemment, la PCR en temps réel s'est avérée une méthode efficace pour quantifier les bactéries lactiques dans les fromages. Furet *et al.* (2004) ont quantifié *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus* et *Lb. johnsonii* dans les produits laitiers fermentés. Cailliez-Grimal *et al.* (2005) ont quantifié *Carnobacterium* dans des fromages français à pâte molle.

Dans notre cas, la PCR en temps réel a été utilisée pour quantifier *S. thermophilus* dans le *Darfiyeh*.

Le couple d'amorces St1-St2 a amplifié l'ADN de *S. thermophilus* dans le caillé témoin. Il convient de rappeler que ce caillé est préparé à partir de lait cru de vache réfrigéré et conditionné à la ferme, puis pasteurisé et emprésuré (voir section 3.5.5.3.1.). Il a été inoculé avec une culture de *S. thermophilus*. A partir d'une culture de *S. thermophilus* contenant 10^8 ufc. mL⁻¹, des PCR en temps réel ont été réalisées avec de la matrice d'ADN diluée, et avec de la matrice du caillé dilué. A une température de 55 °C, les résultats sont identiques à ceux de la PCR classique. Les profils électrophorétiques des produits de PCR, avec une bande de 260 pb, sont montrés dans la **Figure 23**. Vu la similitude des résultats (même rapport entre la quantité d'ADN mesurée par PCR quantitative et le nombre d'ufc. mL⁻¹), les dilutions de l'ADN sont prises en compte pour la suite de cette étude.

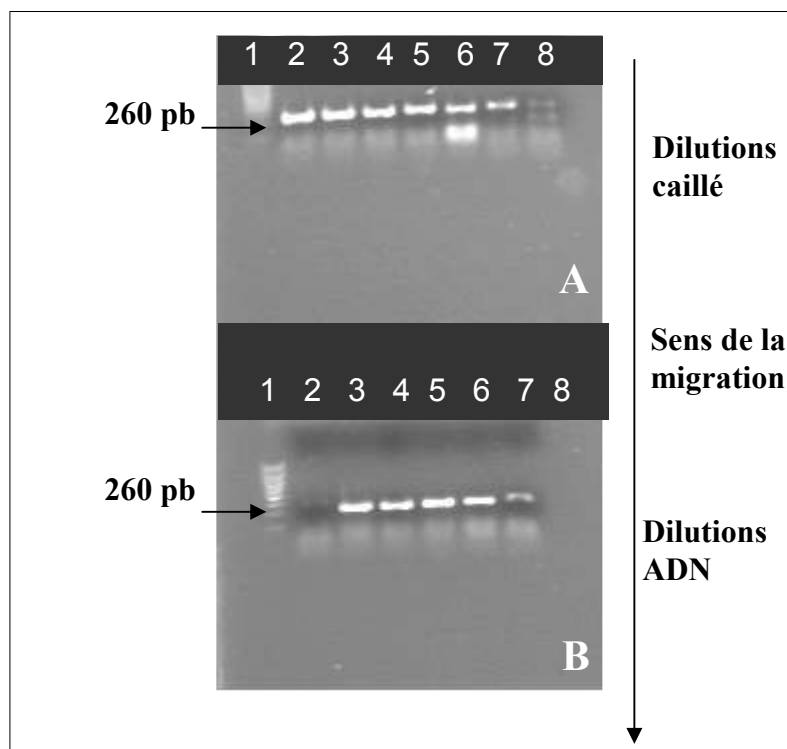


Figure 23. Profils électrophorétiques des produits de PCR avec le couple d'amorces St1-St2 pour la recherche de *S. thermophilus* dans le caillé témoin,

(A) 1 : Marqueur de taille (Smart Ladder SF, de 100 à 1000 pb) ; 2-7 : Dilutions décimales successives du caillé ; 8 : contrôle négatif ;

(B) 1 : Marqueur de taille (Smart Ladder SF, de 100 à 1000 pb) ; 2-7 : Dilutions décimales de l'ADN, respectivement 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ; 8 : contrôle négatif ;

Température d'hybridation : 55 °C ; Essais réalisés en double

La PCR en temps réel a été utilisée pour quantifier *S. thermophilus* dans le *Darfiyeh*. La relation entre le logarithme de cellules par mL de réaction en fonction des valeurs du nombre de cycles (Ct) obtenus avec des dilutions décimales de l'ADN extraits d'une culture de *S. thermophilus* DSM 20617^T inoculée artificiellement à un caillé témoin est linéaire (**Figure 24A**). La limite de détection est de 2 ufc par réaction (20 µL) et la magnitude de linéarité est supérieure à 3 log. L'analyse des courbes de fusion a montré un produit spécifique amplifié avec une valeur de T_m de 90 °C ; aucun pic n'est observé avec le contrôle (**Figure 24C**).

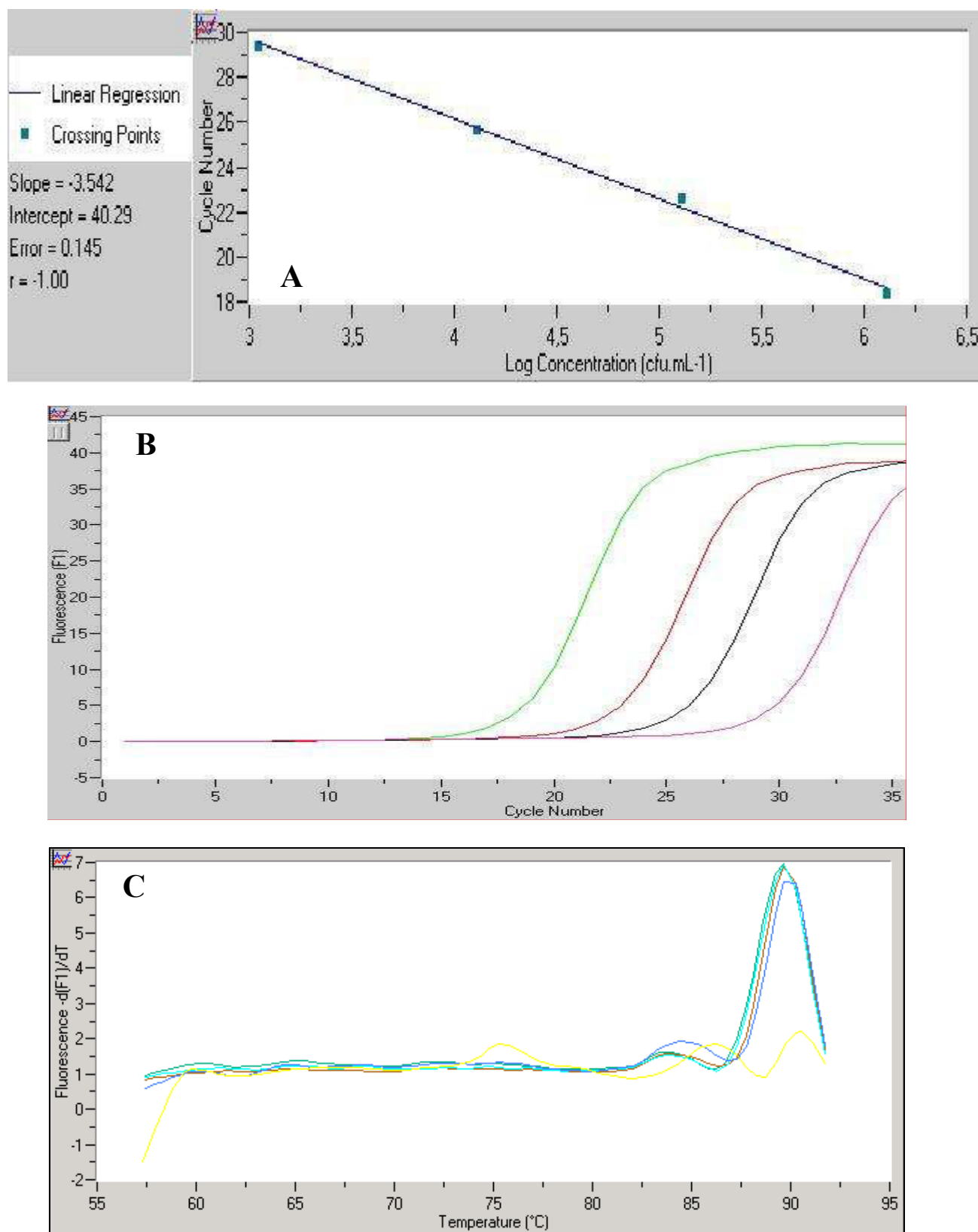


Figure 24. (A) Courbe étalon mettant en rapport la quantité d'ADN de *S. thermophilus* DSM 20617^T mesuré par Light Cycler[®] et le nombre d'ufc. mL⁻¹ ; **(B)** Quantification des dilutions en série de *S. thermophilus* DSM 20617^T par Light Cycler[®] ; **(C)** Courbes de fusion, T_m = 90 °C

Quand l'ADN extrait du *Darfiyeh* a été utilisé comme matrice pour quantifier *S. thermophilus* par Light Cycler®, la réponse a été obtenue avec des dilutions décimales de la matrice de 10^{-1} , montrant de même une T_m de 90 °C. Parmi les échantillons de *Darfiyeh*, seulement le lot B à 40 j d'affinage et le lot C à 40 et 60 j d'affinage ont montré respectivement des valeurs de (Ct) de 32,20 ; 30,13 et 28,40.

Tableau 22. Quantification de *S. thermophilus* par Light Cycler® dans les fromages *Darfiyeh*

Fromages <i>Darfiyeh</i>	Log ufc. g ⁻¹ <i>Darfiyeh</i>
Lot de production A	
20 ^{**}	< 4
40	< 4
60	< 4
Lot de production B	
20	< 4
40	< 4
60	< 4
Lot de production C	
20	< 4
40	< 4
60	4,2
j0 ^{***}	< 4

* Déviation standard, ** Période d'affinage en jours, *** Echantillon *Darfiyeh* à j0 de production

Le seuil de PCR est de 10^4 ufc. g⁻¹ *Darfiyeh* (Tableau 22), par comparaison avec les valeurs obtenues par numération de *S. thermophilus* dans le caillé témoin. Ceci est en concordance avec les travaux de Marino *et al.* (2003) ; *S. thermophilus* est l'espèce dominante au cours de toute la période d'affinage du fromage *Montasio* fabriqué à base de lait cru. Dans une étude sur différents fromages Européens artisanaux, *S. thermophilus* est en revanche dominante dans les fromages frais et les caillés (Cogan *et al.*, 1997). La présence de cette espèce est surtout liée à son rôle dans les processus biochimiques qui se déroulent au cours de l'affinage. Ceci est en concordance avec la théorie qui note que la présence de souches avec des caractéristiques ou rôles particuliers sont surtout liés à un environnement spécifique.

4.2.4.3 Analyse de *E. faecium*

4.2.4.3.1 PCR classique

Le couple d'amorce EM1A-EM1B a été utilisé dans les conditions de Cheng *et al.* (1997). Les conditions de PCR n'ont pas été modifiées. Le profil électrophorétique montre des amplifiats avec tous les échantillons de *Darfiyeh* (**Figure 25, bandes 2-10**). Les bandes obtenues sont de 658 pb.

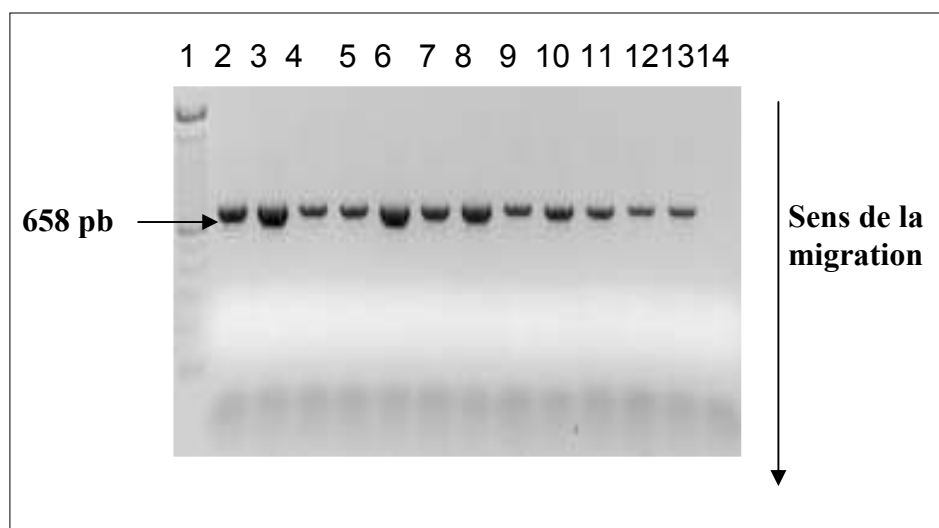


Figure 25. Résultats de la PCR avec le couple d'amorces EM1A-EM1B pour la recherche de *E. faecium* dans le *Darfiyeh*,

1 : Marqueur de taille (Smart Ladder SF, de 100 à 1000 pb) ; 2-4 : production A de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage ; 5-7 : production B de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage ; 8-10 : production C de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage ; 11: Echantillon *Darfiyeh* à J0 de production ; 12 : contrôle positif ; 13 : contrôle positif ; 14: contrôle négatif, Température d'hybridation : 60 °C ; Essais réalisés en double

4.2.4.3.2 PCR en temps réel

La quantification a été réalisée par Light Cycler[®]. La relation entre le logarithme de cellules par mL de réaction en fonction des valeurs du nombre de cycles (Ct) obtenus avec des dilutions décimales de l'ADN extraits d'une culture de *E. faecium* DSM 20477^T inoculée artificiellement à un caillé témoin est linéaire (**Figure 26A**). La magnitude de linéarité est supérieure à 5 log. L'analyse des courbes de fusion a montré un produit spécifique amplifié avec une valeur de T_m de 85 °C (courbes de fusion non illustrées).

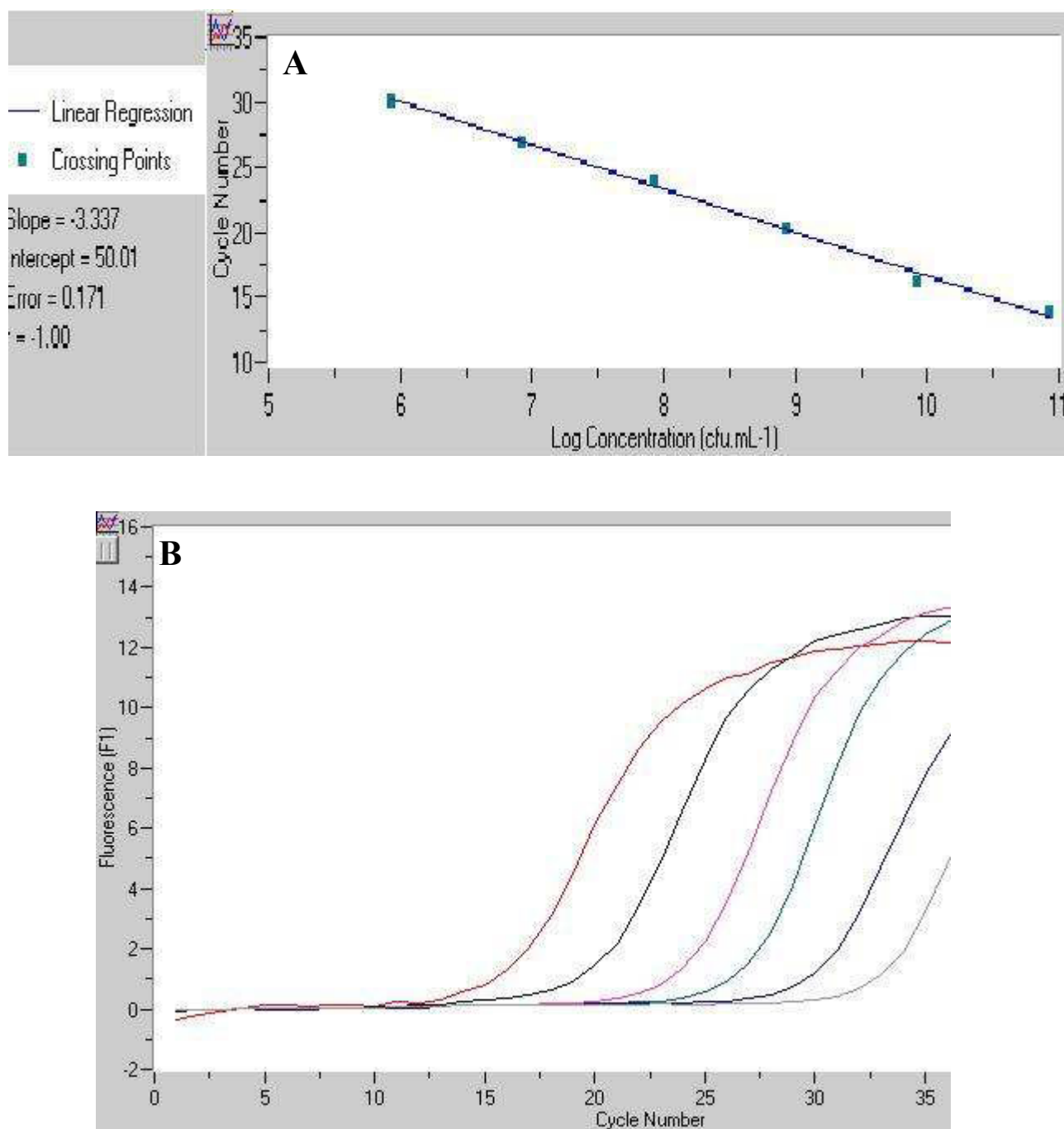


Figure 26. (A) Courbe étalon mettant en rapport la quantité d'ADN d'*E. faecium* DSM 20477^T mesuré par Light Cycler[®] et le nombre d'ufc. mL⁻¹ ; (B) Quantification des dilutions en série d' *E. faecium* DSM 20477^T par Light Cycler[®]

Pour la quantification en temps réel de *E. faecium* dans l'ADN extrait du *Darfiyeh*, les résultats obtenus avec des dilutions à 10^{-2} de l'ADN ont permis la détection des concentrations d' *E. faecium* entre 10^7 et 10^9 ufc.g⁻¹ Darfiyeh (**Tableau 23**).

Tableau 23. Quantification d' *E. faecium* par Light Cycler® dans les fromages *Darfiyeh*

Fromages <i>Darfiyeh</i>	Log ufc. g ⁻¹ <i>Darfiyeh</i>
Lot de production A	
20 ^{**}	7,88
40	9,42
60	7,41
Lot de production B	
20	7,23
40	8,39
60	7,42
Lot de production C	
20	7,47
40	7,18
60	8,20
j0 ^{***}	7,18

* Déviation standard, ** Période d'affinage en jours, *** Echantillon *Darfiyeh* à j0 de production

Il est clair que l'effet de la population bactérienne d' *E. faecium* sur l'affinage du *Darfiyeh* n'est pas du tout négligeable.

4.2.4.4 Analyse de *E. durans*

L'amplification de *E. durans* dans le *Darfiyeh* avec le couple d'amorces DuHiF-DuR et selon les conditions de Kniff *et al.* (2001), donne une bande de faible intensité dans le lot A à 20 j d'affinage (**Figure 27, bande 2**) et dans le lot B (**Figure 27, bande 5-6**) jusqu'à 40 j d'affinage.

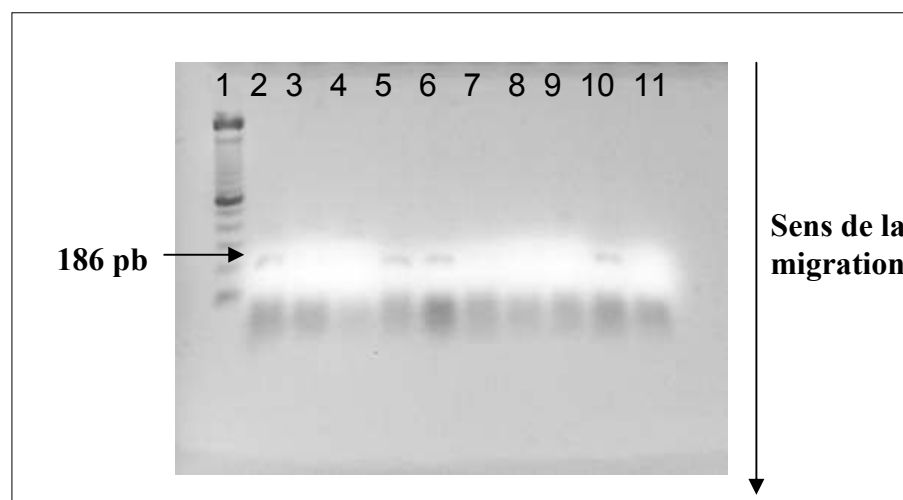


Figure 27. Résultats de la PCR avec le couple d'amorces DuHiF-DuR pour la recherche de *E. durans* dans le *Darfiyeh*,

1 : Marqueur de taille (Smart Ladder SF, de 100 à 1000 pb) ; 2-4 : production A de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage ; 5-7 : production B de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage ; 8-10 : production C de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage ; 11 : contrôle négatif ; Température d'hybridation : 57 °C ; Essais réalisés en double

La présence des entérocoques dans le fromage *Darfiyeh* est en concordance avec leur présence dans les fromages artisanaux produits dans la région méditerranéenne (Franz *et al.*, 1999). *Enterococcus faecium* est l'espèce dominante au cours de l'affinage. Les entérocoques sont abondants dans les fromages produits dans de mauvaises conditions environnementales et avec des procédures artisanales (Alonso-Calleja *et al.*, 2002). Ceci confirme plusieurs observations dans lesquelles ils sont présents dans les fromages après l'affinage, où ils contribuent à l'arôme typique du produit fini, à travers le métabolisme du citrate et leurs activités lipolytique et protéolytique (Cogan *et al.*, 1997). La présence d'*E. durans* dans les fromages pourra provoquer des infections à cause de leurs gènes de virulence (Moellering, 1995).

Les conditions d'amplification d'*E. durans* appliquées en PCR classique n'ont pas été adéquates pour la PCR en temps réel. L'application de différents gradients de température et de différents gradients de $MgCl_2$ n'ont pas abouti ; les profils électrophorétiques après les analyses de la PCR en temps réel montrent des amplifiats de différentes tailles (figures non illustrées).

4.2.4.5 Analyse de *Lc. lactis*

A une température d'hybridation de 45 °C, et dans les conditions de Corroler *et al.* (1999), le couple d'amorces His 1-His 2 amplifie l'ADN de *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Figure 28). Les

résultats expérimentaux montrent que *Lc. lactis* subsp. *lactis* est présente dans tous les échantillons de *Darfiyeh* à l'exception du lot B à 60 j d'affinage et de l'échantillon de *Darfiyeh* à j0 (Figure 28, bande 7-bande 11).

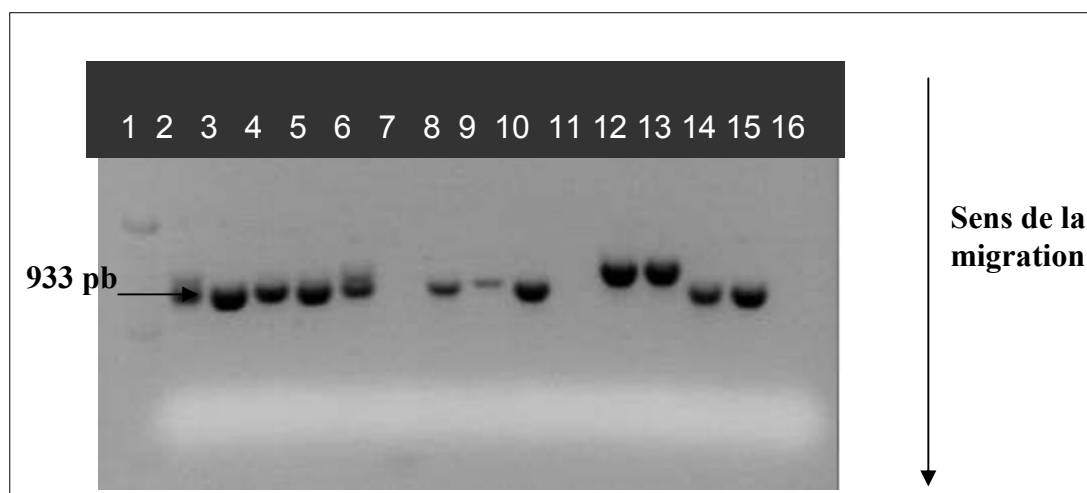


Figure 28. Résultats de la PCR avec le couple d'amorces His 1-His 2 pour la recherche de *Lc. lactis* subsp. *lactis* dans le *Darfiyeh*,

1 : Marqueur de taille (Smart Ladder SF, de 100 à 1000 pb) ; 2-4 : production A de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage ; 5-7 : production B de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage ; 8-10 : production C de *Darfiyeh* à 20, 40 et 60 j d'affinage ; 11: Echantillon *Darfiyeh* à j0 de production ; 12-13 : contrôle positif *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 ; 14-15 : contrôle positif *Lc. lactis* subsp. *lactis* CIP 7056 ; 16 : contrôle négatif ; Température d'hybridation : 45 °C ; Essais réalisés en double

Les doubles bandes de faible intensité (Figure 28, bande 1-bande 6) sont attribuées à *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, par comparaison à la taille de la bande du contrôle positif de *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Il est clair que cette espèce bactérienne n'est pas dominante.

Des résultats négatifs sont obtenus lors des analyses de PCR en temps réel pour essayer de quantifier *Lc. lactis* subsp. *lactis* dans le *Darfiyeh* (figures non illustrées). En se référant aux recommandations générales du manuel du Light Cycler®, la détection optimale d'un produit amplifié ne peut pas excéder 700 pb ; le produit amplifié par le couple d'amorce His 1-His 2 est de 933 pb (voir Tableau 12 de la section 3.5.5. dans Matériels et méthodes).

Lc. lactis subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* sont les deux espèces du genre *Lactococcus* les plus fréquemment isolées dans les fromages traditionnels. Il est intéressant de noter que *Lc. lactis* subsp. *lactis* est l'espèce dominante. Cette espèce est présente dans les fromages au lait cru et elle est associée aux pratiques dans les fermes laitières, plutôt qu'à l'aire géographique d'origine (Corroler *et al.*, 1999). En revanche, les isolats de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* sont moins fréquents ; ils sont incapables de survivre dans la nature et sont exclusivement associés à

l'environnement laitier (Corroler *et al.*, 1998). *Lc. lactis* subsp. *cremoris* est plus sensible au sel que *Lc. lactis* subsp. *lactis*.

4.2.5 Conclusion

Les conclusions partielles que l'on peut tirer de cette étude sont les suivantes:

- Le dénombrement des différents groupes microbiens (lactobacilles mésophiles, lactobacilles thermophiles, bactéries lactiques thermophiles (forme coque), flore aérobie mésophile et microcoques) est en accord avec celui d'autres fromages de chèvres rapportés dans la littérature ;
- L'écosystème bactérien du Darfiyeh au cours de l'affinage est constitué des espèces suivantes : *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *S. thermophilus*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. malodoratus*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ;
- *S. thermophilus*, *E. faecium*, *E. durans*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ont été détectés dans le Darfiyeh par la technique de PCR classique ;
- Le seuil de quantification de *S. thermophilus* par Light Cycler® est de 10^4 ufc. mL⁻¹ et la gamme de quantification d' *E. faecium* se situe entre 10^5 et 10^8 ufc. mL⁻¹.

4.3 Peau de chèvre, enceinte d'affinage du fromage *Darfiyeh* : caractérisation microbiologique, physicochimique et qualitative

Nous avons tenté, dans la mesure du possible de caractériser la peau de chèvre, en nous référant aux travaux réalisés dans le domaine de la tannerie en Inde, où l'on transforme les peaux pour en faire du cuir. A cet effet, des morceaux de peau de chèvre issus des *Dariff* de chaque production de fromage *Darfiyeh* ont été caractérisés du point de vue microbiologique (numérations bactériennes classiques), physico-chimique (taux d'humidité et taux d'azote total) et qualitatif (chute de poils et odeur de putréfaction).

4.3.1 Numérations bactériennes classiques

Les valeurs moyennes du dénombrement bactérien sur de la gélose nutritive des trois *Dariff* A, B et C au cours de 60 j d'affinage sont présentés au **Tableau 24**.

Tableau 24. Numérations bactériennes (ufc.g⁻¹ peau) pour les trois *Dariff* des productions de *Darfiyeh* (A, B et C), (DS* = 0,1)

Durée (j)	<i>Dariff</i> A	<i>Dariff</i> B	<i>Dariff</i> C
20	4,3 x 10 ⁶	4,4 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁶
40	3,0 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶
60	1,3 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶

DS : Déviation standard,

Les résultats sont la moyenne de deux essais

Les valeurs moyennes à 20 j d'affinage du dénombrement de la flore totale cultivée sur de la gélose nutritive pour les trois *Dariff* A, B et C sont respectivement de l'ordre de 4,3 x 10⁶, 4,4 x 10⁶, 3,4 x 10⁶ ufc.g⁻¹ de peau. Ces valeurs sont considérablement inférieures à celles de la littérature pour des peaux traitées avec 40 % de chlorure de sodium pour 14 j et qui sont de l'ordre de 4 x 10¹⁰ ufc.g⁻¹ peau (Kanagaraj *et al.*, 2001, 2005a). Les niveaux de populations sont presque similaires pour les deux *Dariff* A et B.

Les conditions d'affinage du fromage *Darfiyeh* à la température de 10-12 °C et une humidité relative de 85-95 %, ainsi que le salage externe du *Dariff* effectué périodiquement pendant les 60 j d'affinage, se sont avérés adéquats pour préserver la peau de chèvre contre les attaques microbiennes durant toute la période d'affinage. Le sel est doté d'une action éliminatoire de l'eau des tissus, ralentissant ainsi le développement des micro-organismes présents.

4.3.2 Dosage des taux d'humidité et d'azote total

Les valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques classiques (taux d'humidité et taux d'azote total) sont présentées dans le **Tableau 25**.

Tableau 25. Valeurs moyennes du taux d'humidité (%) et du taux de l'azote total (%) pour les trois *Dariff* des productions de *Darfiyeh* (A, B et C), (DS* = 0,1-0,3)

Paramètre physico-chimique	20 j			40 j			60 j		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Humidité (%)	33,13	35,44	36,21	32,26	34,82	35,80	30,63	33,61	34,71
NT (%)	3,07	3,60	3,50	3,15	3,80	3,77	4,80	4,52	4,23

A, B et C : les trois *Dariff* des productions de *Darfiyeh* A, B et C,

Les résultats sont exprimés en pourcentage de deux essais,

DS* : Déviation standard entre 0,1 et 0,3 ; NT : azote total

Des valeurs moyennes d'humidité de 33,13 %, 32,26 % et 30,63 % sont enregistrées respectivement pour les trois *Dariff* A, B et C, à 20 j d'affinage. Ces résultats sont très proches de ceux rapportés dans la littérature pour des peaux de chèvre âgées de 14 j (31 %) et traitées avec 40 % de chlorure de sodium (Kanagaraj *et al.*, 2001). Une diminution progressive du taux d'humidité est observée pour les trois *Dariff* A, B et C avec l'avancement du stade d'affinage. La perte d'eau dans des peaux de chèvre traitées avec 40 % du chlorure de sodium est prononcée pendant les 15 premiers j, (des valeurs de 70 % à j0 et une chute progressive jusqu'à des valeurs de 31 % à 15 j), sans une évolution notable jusqu'à 30 j (Kanagaraj *et al.*, 2005a,b). Il est remarquable que la perte d'eau soit légère et relativement limitée entre 20 et 60 j d'affinage ; des pourcentages de 2,5 %, 1,83 % et 1,5 % sont enregistrés respectivement pour les trois *Dariff* A, B et C. Ceci est probablement dû à l'humidité relative élevée (85-95 %) dans la grotte d'affinage du *Darfiyeh*. Il peut être conclu que le *Dariff* évite l'évaporation rapide de l'eau à la surface du fromage *Darfiyeh* au cours de l'avancement du stade de l'affinage et qu'il peut être considéré comme une véritable enceinte d'affinage au moins jusqu'à 60 j.

Les valeurs de l'azote total des trois *Dariff* des productions de *Darfiyeh* (A, B et C) peuvent être considérées comme une indication du degré de l'attaque microbienne. Les valeurs moyennes de l'azote total augmentent légèrement entre 20 et 40 j d'affinage (respectivement 3,07 %, 3,15 % ; 3,60 %, 3,80 % ; 3,50 %, 3,77 %) avec une évolution plus prononcée entre 40 et 60 j d'affinage (respectivement 4,80 %, 4,52 %, 4,23 %). Ces résultats concordent avec ceux de la littérature dans lesquels des peaux de chèvre âgées de 14 j et traitées avec 40 % de chlorure de sodium ont des valeurs d'azote total de 5,60 % (Kanagaraj *et al.*, 2005a), 3,5 % (Kanagaraj *et al.*, 2005b) et 3,25 % (Kanagaraj *et al.*, 2001).

4.3.3 Evaluation qualitative

La chute de poils et la putréfaction (odeur) sont les deux paramètres pris en compte pour l'évaluation qualitative des morceaux de peau de chèvre. Aucune chute de poils n'est observée au niveau de tous les échantillons. Il faut ajouter que la putréfaction correspond à la dégradation des protéines suite à l'action de micro-organismes protéolytiques. Cette décomposition des organismes, sous l'influence d'agents microbiens, entraîne la production d'amines aliphatiques souvent toxiques, comme la cadavérine et la putrécine qui dérivent de la lysine et de l'asparagine. Bien que faible, l'odorat humain est capable d'informer sur cette toxicité via ces

odeurs extrêmement désagréables. Dans le cas présent, aucune odeur nauséabonde n'a été notée au niveau des échantillons analysés.

Dans une étude sur les alternatives au chlorure de sodium pour prévenir la dégradation des protéines des peaux de chèvre, Kanagaraj *et al.* (2005a) ont observé que des peaux traitées avec 5 % d'acide borique n'ont pas présenté de chute de poils, ni une odeur de putréfaction, indiquant ainsi l'absence d'une activité bactérienne. Dans une étude sur la préservation des peaux de chèvre dans l'objectif de réduire les solides totaux dissous et les chlorures durant le processus de tannage, en utilisant moins de chlorure de sodium, mais avec du sodium méta-bisulphate (SMBS), il a été observé que 1 % de SMBS était capable de préserver les peaux contre la chute de poils et l'apparition de l'odeur de putréfaction (Kanagaraj *et al.*, 2005b).

Cette évaluation qualitative permet de conclure que le *Dariff*, dans les conditions de sa préparation artisanale et grâce au salage externe périodique effectué durant toute la période de l'affinage, est bien préservé au moins jusqu'à 60 j d'affinage.

4.3.4 Détermination de la stabilité hydrothermique de la peau

La stabilité thermique du collagène est une propriété importante pour évaluer la qualité de la peau de chèvre, comme elle indique indirectement toute déstabilisation structurale de la matrice de la peau due à l'attaque microbienne. La stabilité thermique de la peau est estimée par la température de rétrécissement.

Le rétrécissement des morceaux de peau de chèvre, dans le cadre de la détermination de la stabilité hydrothermique de la peau est illustré en **Figure 29**.

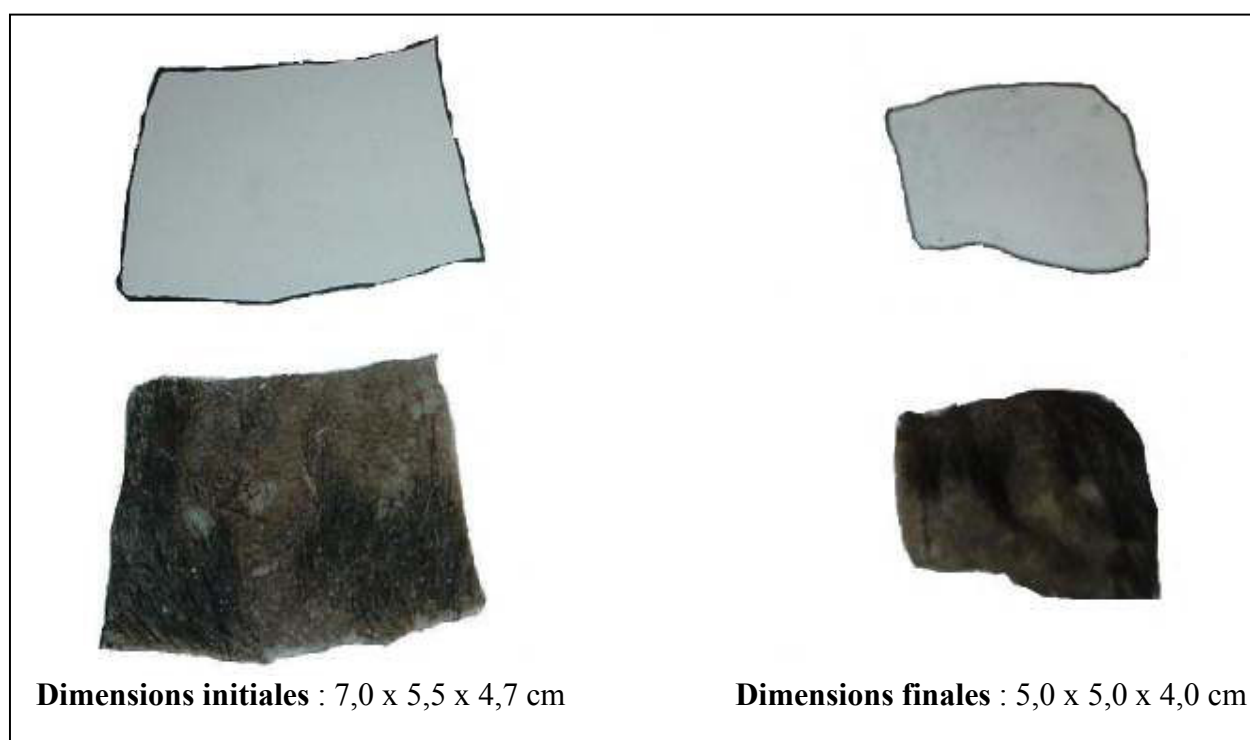


Figure 29. Illustration du rétrécissement d'un morceau de peau de chèvre (*Dariff A* à 20 j d'affinage), dans le cadre de la détermination de la stabilité hydrothermique de la peau

La température de rétrécissement observée pour un morceau de peau du *Dariff A* âgé de 20 j est de 68 °C. Des morceaux de peau de chèvre traités avec du gel de silice et des morceaux traités avec 40 % de chlorure de sodium, ont respectivement des températures de rétrécissement de 72 et de 70 °C après deux semaines de conservation (Kanagaraj *et al.*, 2001). La température de rétrécissement est une manifestation externe de la perte de structure du collagène qui est accompagnée par une absorption de la chaleur, indiquant que ce processus est de nature endothermique (Takenouchi *et al.*, 1995). Le comportement thermique du collagène varie en fonction des agents de préservation utilisés. La matrice de la peau de chèvre n'a subi aucune modification structurale négative. Quand l'agent de préservation est fortement engagé dans le

matériau, on observe une augmentation de la température de rétrécissement de la peau. Avec 40 % de sel, des températures de rétrécissement de 67 et de 72 °C ont été respectivement notées pour des peaux fraîches et des peaux après deux semaines de conservation (Kanagaraj *et al.*, 2005a).

4.4 Etude du transfert des composés aromatiques dans un système solution simulée de *Darfiyeh*/peau

Le fromage *Darfiyeh* s'affinant dans la peau de chèvre ; nous avons opté pour simuler le *Darfiyeh* dans son enceinte naturelle d'affinage. A cet effet, et grâce à un montage expérimental qui nous semble particulièrement intéressant (voir section 3.6.5.1. dans *Matériels et méthodes*), nous avons tenté de suivre le transfert éventuel de trois molécules modèles dans un système solution simulée de *Darfiyeh*/peau.

4.4.1 Transfert de l'acétonitrile dans un système solution aqueuse/peau

Tout au début, et dans le but de déterminer le temps de rétention de l'acétonitrile, des injections ont été effectuées dans les conditions chromatographiques décrites dans la section 3.6.5.2.2. dans *Matériels et méthodes*. Le temps de rétention de 1,03 min a été enregistré.

Au cours d'une première étude, nous avons tenté d'évaluer le transfert d'acétonitrile à travers la peau de chèvre, en utilisant une solution d'un volume de 99 mL H₂O distillée et de 1 mL d'acétonitrile.

4.4.1.1 Tests de perméabilité et d'absorption : module à 7 j

Le module expérimental a été monté pour une période de 7 j. Aucun pic n'a été détecté, aussi bien pour les tests de perméabilité, que pour les tests d'absorption (chromatogrammes non illustrés). Suite aux premiers essais après une durée d'exposition de 7 j, il nous a paru nécessaire d'augmenter le temps d'exposition de la solution aqueuse d'acétonitrile/peau de notre système pour 25 j.

4.4.1.2 Tests de perméabilité et d'absorption : module à 25 j

Après une durée d'exposition de 25 j, des pics chromatographiques significatifs sont apparus. Les résultats des tests de perméabilité et d'absorption après intégration sont montrés au **Tableau 26** et les chromatogrammes correspondants sont illustrés dans l'**annexe 6**.

Tableau 26. Paramètres d'intégration de l'acétonitrile dans le système solution aqueuse/peau après une durée d'exposition de 25 j

	Temps de rétention (min)	Aire (ua)
Test de perméabilité	1,03	86,87
Test d'absorption	1,03	1124,84

ua : unité arbitraire

Une aire de 86,87 (ua) a été enregistrée pour le test de perméabilité, alors qu'une aire de 1124,84 (ua) a été enregistrée pour le test d'absorption. L'acétonitrile est utilisé le plus souvent en tant que solvant organique. Son LogP négatif de $-0,39$ exprime le fait que cette molécule est très soluble dans l'eau, ce qui reflète son caractère hydrophile. Sa faible masse moléculaire de $41,05 \text{ g.mol}^{-1}$, ainsi que son LogP négatif lui permettent d'acquérir une grande solubilité en phase aqueuse. Cette caractéristique permet d'expliquer l'absence de pic liée à une perméabilité et une absorption négligeables après une durée d'exposition de 7 j.

Les premiers tests de transfert de la molécule d'acétonitrile dans un système solution aqueuse/peau pour une durée d'exposition de 25 j, nous ont permis de conclure que la peau de chèvre n'a pas favorisé la perméabilité, mais a plutôt favorisé l'adsorption et l'absorption de l'acétonitrile dans la peau. Les pertes de composés volatils dans le compartiment B du module expérimental (compartiment simulé à l'environnement d'affinage) ont été limitées et ceci après une durée d'exposition de 25 j. Il nous a paru donc évident que les propriétés physico-chimiques de la molécule modèle ainsi que le temps d'exposition sont des facteurs principaux à prendre en considération.

Par la suite, nous tenterons d'explicitier les propriétés physico-chimiques (notamment, la masse moléculaire, la nature chimique, le point d'ébullition, la polarité, les liaisons hydrogène, le LogP, etc.) des molécules modèles. Ceci nous servira à évaluer le comportement de chaque molécule dans le système solution simulée de *Darfiyeh*/peau.

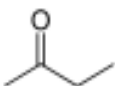
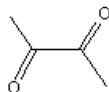
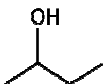
4.4.2 Transfert de 2-butanone, 2,3-butanedione et 2-butanol dans un système solution simulée de *Darfiyeh*/peau

Il convient de rappeler la composition de la solution simulée de *Darfiyeh* : volume total de 25 mL avec une teneur en NaCl de 5 %. Les trois molécules modèles qui ont été introduites dans la solution aqueuse à raison de 0,25 mL chacune, sont la 2-butanone, la 2,3-butanedione et le 2-butanol.

4.4.2.1 Propriétés physico-chimiques des molécules modèles

Dans le cas de notre étude, la distribution des molécules diffusantes dans un système solution simulée de *Darfiyeh*/peau, est dépendante de leurs propriétés physico-chimiques, comme la classe chimique, la masse moléculaire, le point d'ébullition, la polarité, les liaisons hydrogènes, la solubilité, les pourcentages d'oxygène et d'hydrogène, le logP, etc. Les propriétés physico-chimiques des trois molécules modèles sont présentées au **Tableau 27** ci-dessous.

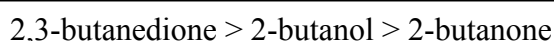
Tableau 27. Propriétés physico-chimiques de 2-butanone, 2,3-butanedione et de 2-butanol

Nom de la molécule	Formule chimique	Formule moléculaire	Classe chimique	MM ^a	Pe ^b	Polarité	Liaisons H ^c	Solubilité ^d	% O	% H	LogP ^e
2-butanone	C ₄ H ₈ O		Cétone	72,11	80	9,01	5,13	18,98	22,19	11,18	0,26
2,3-butanedione	C ₄ H ₆ O ₂		Cétone	86,09	88	13,43	9,52	24,41	37,17	7,02	- 1,48
2-butanol	C ₄ H ₁₀ O		Alcool	74,12	99,5	5,71	14,37	22,09	12,58	13,60	0,60

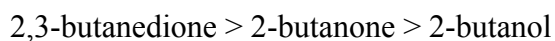
Source : Le logiciel *Molecular Modeling Pro* (ChemSW[®], version 5,1),

^aMasse moléculaire exprimée en g.mol⁻¹, ^bPoint d'ébullition exprimé en °C, ^cExprimé en unité atomique, ^dSolubilité de Hansen (1967) exprimée en MPa^{1/2}, ^eHansch et Leo (1979).

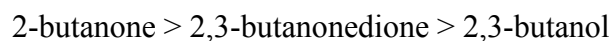
La masse moléculaire est un facteur important ; la taille de la molécule a un grand effet sur le taux des composés absorbés par l'emballage. Il a été observé que des molécules de grande taille sont plus facilement absorbées que des molécules plus petites et les molécules branchées sont aussi plus absorbées que les molécules linéaires (Halek et Chan 1994). Les composés ayant une masse moléculaire élevée ont une solubilité aqueuse faible, ainsi qu'un LogP élevé, parce que la plupart des composés ayant une masse moléculaire élevée sont hydrophobes (Jouquand *et al.*, 2004). Ils ont aussi tendance à être moins volatiles. En terme de masse moléculaire, l'ordre respectif des trois molécules modèles est le suivant :



Les composés organiques polaires ont tendance à avoir une solubilité aqueuse élevée, alors que les composés organiques moins polaires sont moins solubles dans l'eau. Le nombre d'atomes peut être une indication de la proportion d'atomes polaires et non polaires, comme l'oxygène et l'hydrogène (Ertl *et al.*, 2000). En terme de polarité, l'ordre respectif des trois molécules modèles est le suivant :



Les liaisons hydrogène augmentent naturellement l'hydrophilie. Un composé est dit hydrophobe quand il n'a pas la capacité d'établir des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau. Il est souvent apolaire ou de faible polarité, c'est-à-dire que des interactions électrostatiques avec l'eau sont difficiles, voire impossibles. Ainsi, un composé hydrophobe n'est soluble que dans les solvants organiques avec lesquels il peut établir des interactions de Van der Waals. Au sein d'une solution, le mouvement des électrons chargés négativement autour du noyau chargé positivement engendre des forces électromagnétiques attractives : les molécules se comportent comme des dipôles électriques où les charges opposées s'attirent. Par contre, un composé est hydrophile quand il a la capacité à créer des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau. Les liaisons hydrogène sont plus fortes que les forces de Van der Waals, mais plus faibles que des liaisons covalentes. En terme d'hydrophobie, l'ordre respectif des trois molécules modèles est le suivant :



Pour ce qui est du LogP, il est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau.

$$\text{LogP} = \text{Log} (C_{\text{octanol}}/C_{\text{eau}})$$

Ce coefficient permet d'appréhender le caractère hydrophobe (lipophile) ou hydrophile d'une molécule. En effet, si LogP est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère hydrophobe et inversement (Hansch et Leo, 1979). En terme de LogP, l'ordre respectif des trois molécules modèles est le suivant :

$$\text{2-butanol} > \text{2-butanone} > \text{2,3-butanedione}$$

Le point d'ébullition d'un composé est prédéterminé par ses interactions dans un liquide. On suppose qu'il est alors lié directement à la structure chimique de la molécule. Un composé ayant le point d'ébullition le plus faible, est considéré le plus volatil. En terme de volatilité, l'ordre respectif des trois molécules modèles est le suivant :

$$\text{2-butanone} > \text{2,3-butanedione} > \text{2-butanol}$$

A une température donnée, la volatilité des composés, qui ont le même nombre d'atomes de carbone dans leur structure, diminue de la manière suivante: ester > cétone > aldéhyde > alcool > lactone (Covarrubias-Cervantes *et al.*, 2004).

Ainsi, la connaissance des propriétés physico-chimiques des molécules modèles (masse moléculaire, solubilité, polarité, LogP, etc) est indispensable pour évaluer leur comportement dans le système solution simulée de *Darfiyeh*/peau. Il faut ajouter que ce comportement est aussi fonction des interactions possibles entre les trois molécules dans le système de simulation supposé complexe, du pourcentage de NaCl de la solution aqueuse (5 %) et aussi fonction de la durée d'exposition.

A ajouter que la présence de 5 % de NaCl dans la solution aqueuse simulée pourrait avoir une influence sur l'équilibre du système. Une fois le chlorure de sodium est dissous dans l'eau ; il faut suffisamment d'énergie (réaction endothermique) pour casser les liaisons électrostatiques qui maintiennent les ions Na^+ et Cl^- dans leur forme solide. La structure du NaCl est électriquement neutre qui fait donc intervenir autant d'ions Na^+ que d'ions Cl^- . Lors de la mise en solution aqueuse du solide ionique, l'eau détruit le cristal. Le moment dipolaire de l'eau agit sur la solvation des ions. Il est à noter que la quantité de sel influe sur le point d'ébullition. Plus la concentration en NaCl est grande, plus le point d'ébullition est élevé. Une solution aqueuse à 10 % NaCl a un point d'ébullition de 104 °C. L'augmentation de la concentration en NaCl fait augmenter la masse volumique également. Ainsi, la concentration d'une substance a une influence sur une des propriétés de la solution, soit la masse volumique. Donc, la concentration en NaCl de la solution influence autant la masse volumique et le point d'ébullition de la solution (Duvivier *et al.*, 1998).

Nous concluons alors que la présence de NaCl a une influence sur les propriétés d'une solution aqueuse. En partant de cette hypothèse, le NaCl pourra avoir une influence sur le transfert des molécules modèles dans le système solution simulée de *Darfiyeh*/peau.

Selon Guichard (2002), l'addition des sels à des solutions aqueuses contenant des composés aromatiques, fait augmenter la concentration de ces composés dans la phase vapeur.

Perez-Juan *et al.*, (2007) ont étudié l'effet de l'addition de différents sels sur la capacité de liaison entre des composés volatils et les extraits de protéines solubles du porc. Mirhosseini *et al.* (2007) ont étudié l'effet de l'extraction des composés volatils à 25, 35 et 45 °C, sous l'effet de l'addition ou non du NaCl. Ces auteurs ont observé que l'addition de NaCl produit un effet de "*Salting out*" pour tous les composés volatils étudiés. Le "*Salting out*" augmente la force ionique dans les solutions aqueuses, tout en diminuant la solubilité des composés organiques, et de ce fait, l'extraction des volatils par la méthode SPME (micro extraction sur phase solide) est améliorée.

Poll et Flink (1984) ont étudié l'effet de l'addition de NaCl sur la concentration des composés volatils dans le jus de pomme. Ils ont observé que l'effet de l'addition de NaCl dépend du composé volatil étudié ; la concentration de vapeur dans l'espace de tête augmente de quatre fois pour les alcools et de trois fois et demi pour les aldéhydes.

4.4.2.2 Tests de perméabilité et d'absorption : module à 20, 40 et 60 jours

Les résultats des tests de perméabilité et d'absorption des molécules aromatiques dans un système solution simulée de *Darfiyeh*/peau sont illustrés respectivement dans les **Tableaux 28 et**

29 ci-dessous. Les temps de rétention des molécules modèles sont mentionnés dans la section 3.6.5.3.2. dans *Matériels et méthodes*.

Tableau 28. Résultats des tests de perméabilité des molécules aromatiques dans un système solution simulée de *Darfiyeh*/peau, après 20, 40 et 60 j d'exposition

Nom de la molécule modèle	Aire des pics (unité arbitraire)		
	Module à 20 j	Module à 40 j	Module à 60 j
2-butanone	351,46	-	26259,43
2,3-butanedione	39,72	-	-
2-butanol	468,41	-	-

Tableau 29. Résultats des tests d'absorption des molécules aromatiques dans un système solution simulée de *Darfiyeh*/peau, après 20, 40 et 60 j d'exposition

Nom de la molécule modèle	Aire des pics (unité arbitraire)		
	Module à 20 j	Module à 40 j	Module à 60 j
2-butanone	28,01	502,99	342,82
2,3-butanedione	143,84	9314,51	4384,42
2-butanol	<u>305,25</u> 477,10*	<u>3238,86</u> 13056,36	<u>68,29</u> 4795,53

* Σ aire (2-butanone + 2,3-butanedione + 2-butanol)

Les résultats obtenus seront traités par la suite en fonction de l'effet des caractéristiques physico-chimiques des molécules modèles (notamment la masse moléculaire, le point d'ébullition, la famille chimique, les liaisons hydrogène, le LogP, etc) et des caractéristiques des morceaux de peau (notamment l'épaisseur, voir **Tableau 30**), ainsi que de l'effet du NaCl dans le système solution *Darfiyeh*/peau.

Tableau 30. Epaisseur des morceaux de peau de chèvre destinés à séparer entre les deux compartiments A et B

Nombre de mesures	Module à 20 jours	Module à 40 jours	Module à 60 jours
1	4,4*	4,2	5,2
2	3,6	4,0	5,2
3	3,8	4,0	5,0
4	3,8	4,0	5,4
5	3,8	4,0	5,6
6	3,8	4,2	5,6
7	3,8	4,4	5,6
8	4,4	4,0	5,4
9	4,0	4,0	5,6
10	4,2	4,2	5,6
Moyenne	3,96	4,10	5,42

* Mesures faites à l'aide d'un micromètre (Messmer, Londres), résultat exprimé en mm

Il faut noter que le taux de 5 % de NaCl dans la solution simulée de Darfiyeh peut permettre aux ions salins de se lier aux fibres du collagène de la peau et par la suite agir sur sa texture. Dans une étude récente, Vankar et Dwivedi (2008) ont noté que le NaCl, tout en étant un agent bactériostatique, a une grande affinité pour les fibres du collagène de la peau de buffle et de certains autres animaux notamment la chèvre. De ce fait il retient l'eau entre les interstices des fibres du collagène.

Nilsson *et al.* (2006) ont observé une augmentation de la perméabilité avec une solution aqueuse de glucose, additionnée de NaCl. Ceci peut s'expliquer par la présence des ions Na^+ et Cl^- qui sont supposés pénétrer au tout début dans les couches superficielles de la membrane. Les interactions possibles entre les électrolytes agissent sur la texture de la membrane et pourront causer un gonflement, provoquant ainsi une diminution de la rétention. Le changement intrinsèque dans la perméabilité de la membrane semble lié au changement de sa teneur en eau (Freger, 2004). En étudiant l'effet de la diffusion du chlorure de sodium à travers des tissus de porc, Gravier *et al.* (2006), une tendance à la rétention de l'eau couplée à une solubilisation partielle des protéines a été observée pour des concentrations faibles en NaCl, alors qu'à des concentrations élevées de NaCl, le phénomène inverse se produit : la membrane perd son eau, les protéines précipitent et la matrice se déforme.

4.4.2.2.1 Module à 20 jours d'exposition

A une durée d'exposition de 20 j, des aires de 39,72, 351,46 et de 468,41 (ua) ont été respectivement enregistrées pour le test de perméabilité de la 2,3-butanedione, de la 2-butanone

et du 2-butanol à travers la peau. Dans le même temps des aires de 28,01, 143,84 et de 305,25 (ua) ont été enregistrées pour le test d'absorption de 2-butanone, de la 2,3-butanedione et du 2-butanol par la peau. Les chromatogrammes correspondants sont montrés dans la **Figure 30**.

A partir des résultats obtenus, nous apercevons qu'après 20 j d'exposition, la 2-butanone et le 2-butanol ont été transférés plus vite et ont été moins absorbés par la peau que la 2,3-butanedione qui a été fortement absorbée. Le 2-butanol a été le plus absorbé par la peau, en comparaison avec la 2-butanone qui a été la moins absorbée par la peau.

En terme de perméabilité à travers la peau à 20 j d'exposition, l'ordre respectif des trois molécules modèles est le suivant :

$$2\text{-butanol} > 2\text{-butanone} > 2,3\text{-butanedione}$$

En terme d'absorption par la peau, à 20 j d'exposition, l'ordre respectif des trois molécules modèles est le suivant :

$$2\text{-butanol} > 2,3\text{-butanedione} > 2\text{-butanone}$$

Avec leur LogP positif, la 2-butanone et le 2-butanol voient leur solubilité diminuer et leur perméabilité augmenter par voie de conséquence. Il faut ajouter qu'en terme de polarité, ces deux composés sont les moins polaires (2,3-butanedione > 2-butanone > 2-butanol), donc ils ont tendance à fuir la solution aqueuse, très polaire, et à s'échapper à travers la peau vers le compartiment B (simulé à l'environnement extérieur de l'enceinte d'affinage).

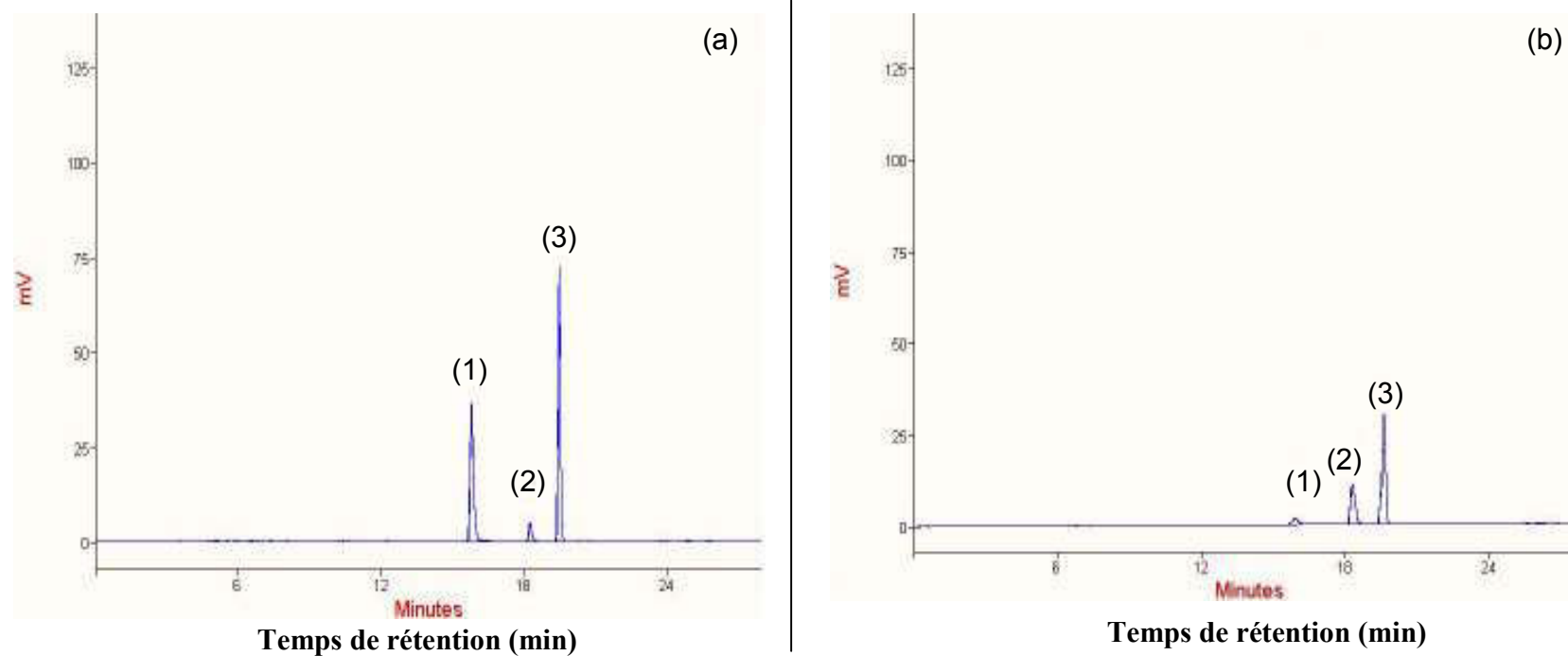


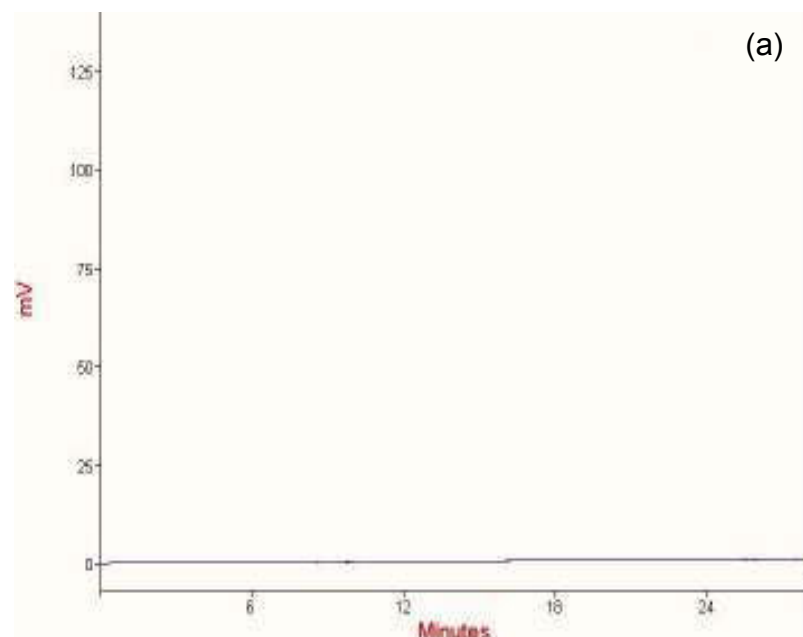
Figure 30. Chromatogrammes des tests de perméabilité (a) et d'absorption (b) d'une solution simulée de *Darfiyeh* (volume total 25 mL, 5 % NaCl, 0,25 mL 2-butanone, 0,25 mL 2,3-butanedione, 0,25 mL 2-butanol), après une durée d'exposition de 20 jours

Les pics identifiés sont : (1) 2-butanone, (2) 2,3-butanedione, (3) 2-butanol

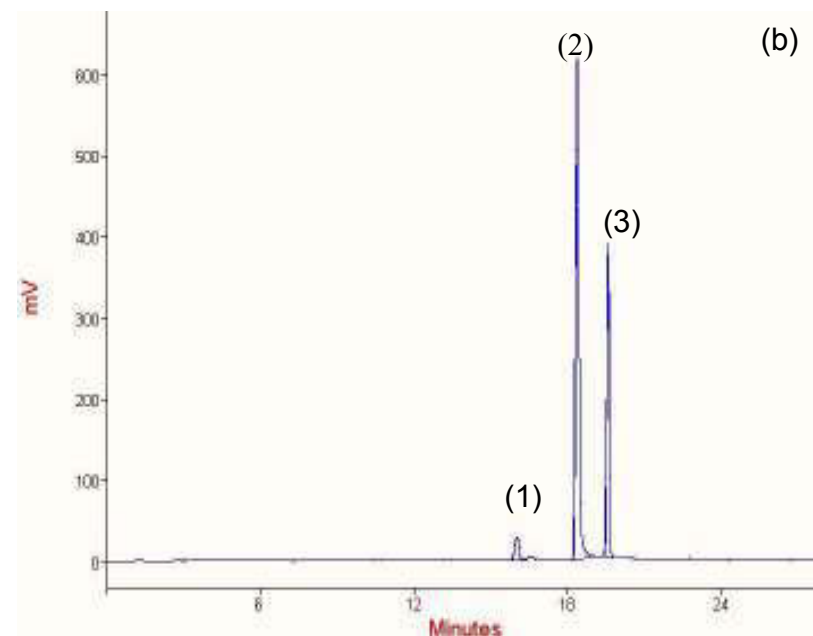
Dans une étude effectuée par Trifunovic et Tragardh (2006), il a été observé que des molécules de masse moléculaire faible ont tendance à diffuser ensemble. Sur la base de ce raisonnement, la perméabilité la plus prononcée de la 2-butanone et du 2-butanol à travers la peau pourrait être due au fait qu'ils possèdent de faibles masses moléculaires (respectivement 72,11 et 74,12 g.mol⁻¹). Cette tendance à "l'agrégation" est aussi observée indirectement par la différence au niveau de la solubilité de ces composés (respectivement 18,98 et 22,09 MPa^{1/2}), due à leur nature chimique différente. Comme les alcools possèdent des groupements hydroxyles, ils peuvent établir des liaisons hydrogènes entre eux, de façon similaires aux liaisons hydrogène entre molécules d'eau. Avec son LogP négatif (-1,48) reflétant un caractère hydrophobe le moins poussé (2-butanol > 2-butanone > 2,3-butanedione) et un caractère polaire le plus poussé (2,3-butanedione > 2-butanone > 2-butanol) parmi les trois molécules modèles, la 2,3-butanedione montre une grande solubilité dans la phase aqueuse (24,41 MPa^{1/2}). Par conséquent, elle est adsorbée à la surface de la peau, voire même absorbée dans la peau, avec une perméabilité faible dans le système solution simulée de *Darfiyeh*/peau, donc une capacité de transfert limitée.

4.4.2.2.2 Module à 40 jours d'exposition

Après une durée d'exposition de 40 j, le test de perméabilité est resté négatif et aucune des trois molécules n'a été détectée (**Figure 31a**). Cependant des aires de 502,99, 3238,86 et 9314,51 (ua) ont été enregistrées respectivement pour le test d'absorption de la 2-butanone, du 2-butanol et de la 2,3-butanedione (**Figure 31b**). Il est clair que la 2-butanone, la 2,3-butanedione et le 2-butanol ont été absorbés par la peau, sans qu'aucune perméabilité n'ait pu être mise en évidence pour ces trois molécules (**Tableau 28**).



Temps de rétention (min)

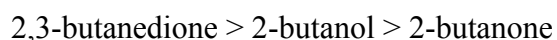


Temps de rétention (min)

Figure 31. Chromatogrammes des tests de perméabilité (a) et d'absorption (b) d'une solution simulée de *Darfiyeh* (volume total 25 mL, 5 % NaCl, 0,25 mL 2-butanone, 0,25 mL 2,3-butanedione, 0,25 mL 2-butanol), après une durée d'exposition de 40 jours

Les pics identifiés sont : (1) 2-butanone, (2) 2,3-butanedione, (3) 2-butanol

En terme d'absorption par la peau à 40 j d'exposition, l'ordre respectif des trois molécules modèles est le suivant :



Ceci pourra être expliqué en tenant compte des trois volets suivants de raisonnement :

- Après une durée d'exposition de 40 j, les trois molécules sont supposées être en saturation dans le compartiment B, en comparant avec la durée d'exposition de 20 j. Etant donné leur comportement à 20 j, elles ont pu être réabsorbées depuis le compartiment B vers la peau. Cette explication pourrait aussi être soutenue par le taux d'absorption des trois composés, dont le total des aires est de 13056 (ua) à 40 j d'exposition contre seulement 477,10 (ua) à 20 j d'exposition. Selon Nielsen *et al.*, (1992b), la saturation due à une concentration élevée des composés dans un système, fait diminuer le coefficient de partage et de ce fait, la solubilité de ces composés augmente, ce qui provoque une diminution corrélative de leur perméabilité.

Sur la base de ce raisonnement, il s'est avéré que dans notre système solution simulée de Darfiyeh/peau, et jusqu'à 40 j d'exposition, la peau de chèvre était capable de retenir des molécules volatiles.

- D'après l'épaisseur de la peau utilisée dans le cas de ce montage expérimental (4,10 mm pour 3,96 mm dans le cas du module de 20 j d'exposition) (voir **Tableau 30**), il se peut que la peau agisse comme un agent absorbant, en tenant compte d'un temps d'exposition doublé (2x 20 j). Ces conditions se sont avérées suffisantes pour capter les composés volatils et éviter ainsi leur fuite vers le compartiment B. Il a été observé dans la littérature qu'indépendamment de la nature du composé aromatique se trouvant dans un système, de sa concentration et de la température, la sorption des composés augmente avec l'épaisseur de l'emballage (Dury-Brun *et al.*, 2008a).

- Le comportement d'une molécule en solution aqueuse est forcément différent de celui de la même molécule en interaction avec les macromolécules d'un matériau semi-humide et complexe tel qu'un fromage. Dans certains systèmes de transfert de composés volatils dans une solution simulée/polymère, le mécanisme de sorption est beaucoup plus important que celui de la perméabilité ; cette dernière augmente avec l'hydrophobie des composés constituant le système (Overington *et al.*, 2008).

4.4.2.2.3 Module à 60 jours d'exposition

Après une durée d'exposition de 60 j, seule la 2-butanone a été détectée par le test de perméabilité à travers la peau. Une aire de 26259,43 (ua) a été enregistrée (**Figure 32a**). Dans les mêmes conditions, des aires de 68,29, 342,82 et 4384,42 (ua) ont été enregistrées respectivement pour le 2-butanol, la 2-butanone et la 2,3-butanedione (**Figure 32b**).

En fonction de leur absorption par la peau à 60 j d'exposition, l'ordre respectif des trois molécules modèles est :

$$2,3\text{-butanedione} > 2\text{-butanone} > 2\text{-butanol}$$

On s'aperçoit d'après ces résultats, que la 2,3-butanedione a été la plus absorbée par la peau, sans qu'aucune perméabilité n'ait été enregistrée à travers la peau. Toutefois, le 2-butanol a été le moins absorbé, sans qu'aucune perméabilité n'ait été enregistrée.

Il faut rappeler que la 2-butanone est le composé le plus volatil parmi la 2,3-butanedione et le 2-butanol, avec les liaisons hydrogène les plus faibles : 5,13 unités atomiques, contre 9,52 et 14,37 unités atomiques pour la 2,3-butanedione et le 2-butanol (**Tableau 27**). Ces liaisons hydrogène faibles sont corrélées à son caractère hydrophobe. Possédant la solubilité la plus faible parmi les trois molécules ($18,29 \text{ MPa}^{1/2}$), la 2-butanone est la plus perméable.

Compte tenu de sa masse moléculaire la plus faible, et vu l'épaisseur de la peau dans le cas de ce montage expérimental qui est de l'ordre de 5,42 mm, la 2-butanone pourrait se trouver dans l'impossibilité d'être réabsorbée par la peau, comme les deux autres composés.

Sur la base de ce raisonnement, tout en tenant compte de celui exposé à 40 j et considérant l'épaisseur de la peau dans le cas de ce montage expérimental (5,42 mm), la 2-butanone pourrait se trouver dans l'impossibilité d'être réabsorbée par la peau, à l'inverse des deux autres composés.

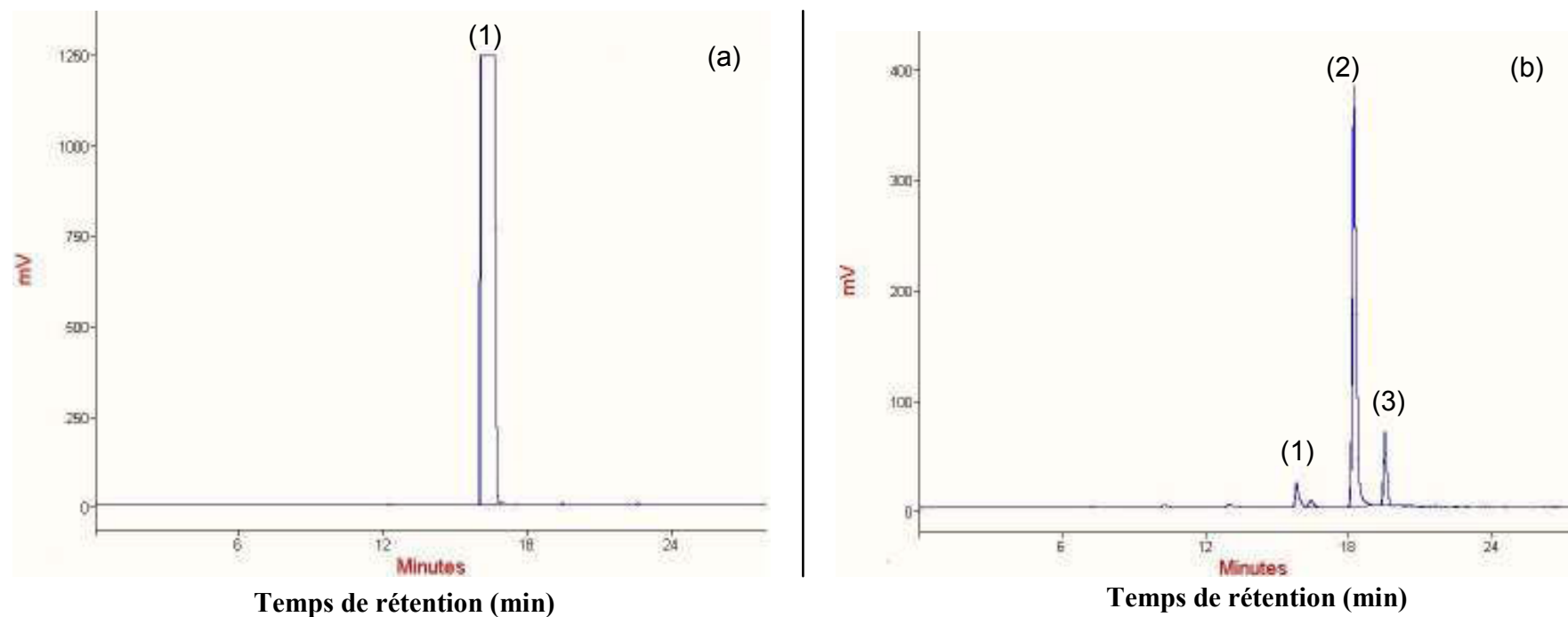


Figure 32. Chromatogrammes des tests de perméabilité (a) et d'absorption (b) d'une solution simulée de *Darfiyeh* (volume total 25 mL, 5 % NaCl, 0,25 mL 2-butanone, 0,25 mL 2,3-butanedione, 0,25 mL 2-butanol), après une durée d'exposition de 60 jours

Les pics identifiés sont : (1) 2-butanone, (2) 2,3-butanedione, (3) 2-butanol

En terme de l'absorption de la 2,3-butanedione dans le système solution simulée de *Darfiyeh*/peau, et après 40 et 60 j d'exposition, la 2,3-butanedione a été la plus absorbée par la peau parmi les trois molécules. Sur la base du raisonnement énoncé précédemment à 40 j, la 2,3-butanedione est supposée migrer depuis la peau vers le compartiment A (9314,51 ua à 40 j contre 4384,42 ua à 60 j). Le même raisonnement pourrait s'appliquer pour la 2-butanone et le 2-butanol, tenant compte des aires enregistrées (qui sont supérieures à 40 j qu'à 60 j).

Ceci est mieux concrétisé en considérant le transfert d'une molécule modèle dans le système solution simulée de *Darfiyeh*/peau comme schématisé ci-dessous :

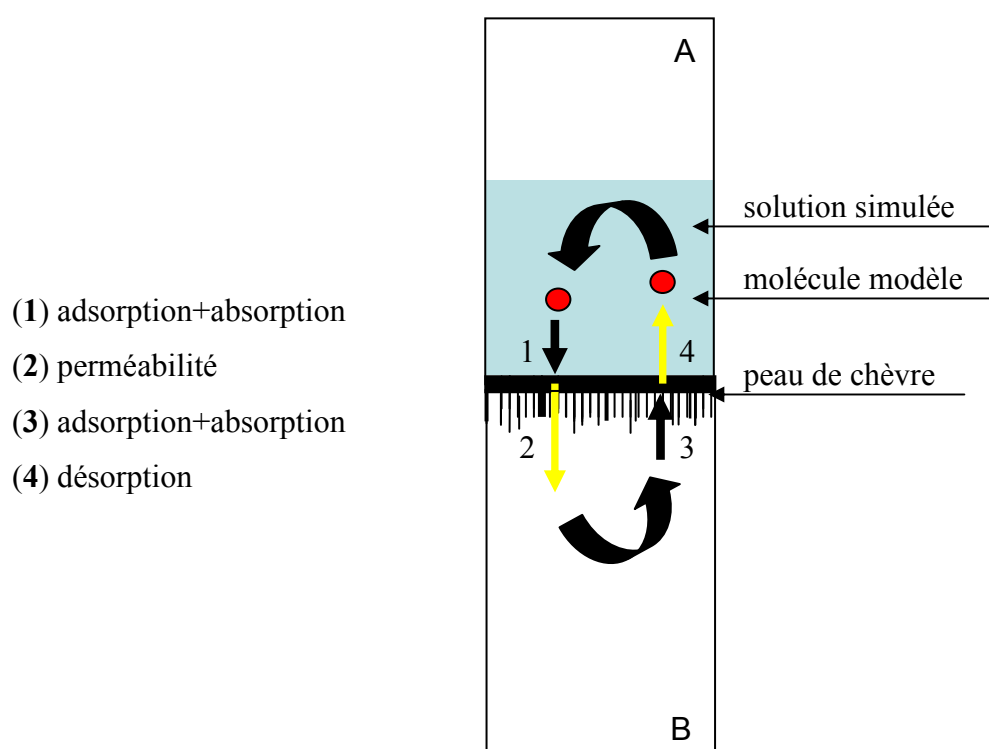


Figure 33. Trajectoire d'une molécule modèle dans un système solution simulée de *Darfiyeh*/peau, après 60 j d'exposition.

La saturation des vapeurs des molécules modèles dans le compartiment B favorisent leur absorption par la peau à 40 j. L'augmentation de la durée d'exposition jusqu'à 60 j favorise la désorption depuis la peau vers la solution simulée de *Darfiyeh* dans le compartiment A.

4.4.2.3 Conclusion

Les conclusions partielles qu'on peut tirer de cette étude sont :

- A 20 j d'exposition, la perméabilité des molécules modèles est favorisée aux dépens de leur absorption. Cette propriété dépend de la nature des molécules testées ;
- A 40 j d'exposition, les molécules modèles sont absorbées par la peau alors que la perméabilité s'effondre jusqu'à devenir nulle. Le temps d'exposition, l'épaisseur de la peau, et les paramètres de solubilité de ces molécules expliquent leur comportement.
- A 60 j d'exposition, et sur la base du raisonnement à 40 j d'exposition, les molécules modèles, régis toujours par leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que par l'augmentation de la durée d'exposition, ont tendance à être désorbées depuis la peau vers la solution simulée de Darfiyeh dans le compartiment A.

5. Conclusion générale et perspectives

5. Conclusion générale et perspectives

Cette étude a été conduite dans le but de valoriser les laits de chèvre de la région montagnarde nord libanaise par leur transformation en fromages *Darfiyeh*. L'établissement de leurs caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques a été conduit en vue de la création d'une appellation d'origine. Parallèlement à cet objectif, nous avons tenté de mieux comprendre l'affinage du *Darfiyeh* qui s'effectue dans des conditions particulièrement originales, c'est-à-dire dans une outre en peau de chèvre. Nous avons opté pour une simulation du transfert de molécules aromatiques modèles, grâce à un montage expérimental dans lequel deux compartiments figurant l'intérieur de l'outre et l'environnement extérieur, ont été séparés par une membrane réalisée en peau de chèvre.

Au cours de cette étude, nous avons atteint un certain nombre des objectifs que nous nous étions fixés au début de notre travail :

- Nous avons pu, d'une part, caractériser la composition physico-chimique des laits de chèvre destinés à la fabrication du *Darfiyeh* et, d'autre part, celle des fromages en cours d'affinage pendant une période de 60 jours, ce qui correspond à la durée moyenne d'affinage.
- Nous avons suivi la protéolyse par l'évolution des fractions azotées et la lipolyse par l'évolution de l'indice d'acide de la matière grasse au cours de l'affinage.
- Nous avons pu suivre le profil des composés aromatiques développés au cours de l'affinage du *Darfiyeh* par chromatographie en phase gazeuse à espace de tête.
- Nous avons pu évaluer l'évolution des proportions relatives des flores bactériennes au cours de l'affinage et nous sommes parvenus à l'identification des bactéries lactiques présentes dans le *Darfiyeh* selon deux approches : d'abord par la culture des micro-organismes sur milieux sélectifs, suivie d'une identification classique jusqu'au niveau genre/espèce, puis par la technique dite de *Temporal Temperature Gel Electrophoresis* (TTGE).
- Les souches les plus importantes, soit *S. thermophilus*, *E. faecium*, *E. durans* et *Lc. lactis* subsp. *lactis* ont été identifiées par PCR classique. *S. thermophilus* et *E. faecium* ont, par ailleurs été quantifiées par PCR en temps réel.

- Nous avons effectué la caractérisation microbiologique, physico-chimique et qualitative d'une peau de chèvre destinée à servir d'encreinte d'affinage du *Darfiyeh*. Nous avons ensuite tenté d'appréhender le transfert de quelques molécules aromatiques modèles dans un montage expérimental simulant le système fromage/peau de chèvre/environnement extérieur.

Dans une première étape, la caractérisation physico-chimique du *Darfiyeh* nous a permis de le classer dans la catégorie des fromages de chèvre à pâte mi-dure. Une protéolyse modérée caractérise ce fromage, elle se traduit par une augmentation significative des valeurs d'azote non-caséinique (ANC) et d'azote non protéique (ANP) au cours de l'affinage. Le *Darfiyeh* subit également une lipolyse modérée. Les acides gras à courte et longue chaîne semblent contribuer à une différenciation nette entre les divers lots de production de *Darfiyeh* qui évoluent de façon non uniforme au cours de l'affinage.

Cette première approche pourrait être complétée par des analyses élémentaires portant sur la mesure de la concentration en acides gras libres au cours de l'affinage. Si ce fromage doit être qualifié d'une appellation d'origine, les laits de chèvre destinés à sa fabrication doivent être standardisés. La fabrication et l'affinage doivent être soumis également à de nombreux contrôles. La production devra être planifiée en fonction des deux saisons de production (printemps et été), ceci chez les différents producteurs de la même région montagnarde nord libanaise, afin de valider les résultats obtenus.

Les composés volatils ont été extraits par la méthode de micro-extraction sur phase solide (SPME). Nous avons ainsi pu identifier 16 composés volatils répartis ci-après en fonction de leur nature chimique : 2 aldéhydes, 6 cétones et 8 alcools. Le 3-méthyl butanal, le 1-phényl éthanol et le 1-octanol sont les trois composés clés ayant un intérêt particulier : ils pourraient être responsables de l'arôme caractéristique typique du *Darfiyeh*. Des analyses sensorielles simultanées, au travers de tests organoleptiques à divers stades de l'affinage dans le but d'établir la qualité sensorielle du *Darfiyeh*, seraient particulièrement intéressantes. En corrélant la nature des composés volatils identifiés avec l'intensité et la qualité de la flaveur, il serait alors possible de définir ultérieurement une période d'affinage optimale, qui correspondrait aux attentes du consommateur.

Dans une deuxième étape, nous avons évalué la signature microbienne du *Darfiyeh* en étudiant l'évolution des proportions relatives des composants de la microflore au cours de l'affinage. Les résultats ont montré une concordance évidente avec les dénombrements établis sur d'autres

fromages de chèvre rapportés dans la littérature. Une image globale et dynamique des communautés bactériennes du *Darfiyeh* a été réalisée par la technique TTGE. Le profil TTGE a confirmé la présence de bandes associées à *S. thermophilus*, *E. faecium*, *E. durans*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Le travail a été poursuivi avec l'équipe de microbiologie alimentaire pour le clonage des produits issus de PCR puis leur séquençage. La comparaison des séquences avec celles présentes dans les bases de données a permis de déterminer la présence de *Staphylococcus haemolyticus*, *Clostridium bifermentans* ou *Eubacterium tenue* et *Escherichia coli*.

Des techniques de PCR classique nous ont permis de détecter *S. thermophilus*, *E. faecium*, *E. durans*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Une technique aussi performante que la PCR en temps réel nous a permis de quantifier *S. thermophilus* et *E. faecium* en utilisant la technique du *Light Cycler*[®]. Les résultats obtenus avec des dilutions 10^{-2} de l'ADN ont permis de détecter *E. faecium* entre 10^5 et 10^8 ufc. mL⁻¹. Les résultats obtenus avec des dilutions 10^{-1} de l'ADN nous ont permis de déceler le seuil de quantification de *S. thermophilus* qui est de 10^4 ufc. mL⁻¹. Cependant, des essais pour tenter de quantifier *E. durans* et *Lc. lactis* subsp. *lactis* dans le *Darfiyeh*, n'ont pas abouti. La recherche des meilleures conditions d'amplification pour quantifier *E. durans*, ainsi que le choix d'autres oligonucléotides bien définis pour *Lc. lactis* subsp. *lactis* pourraient compléter le travail effectué jusqu'ici. L'objectif final serait toujours de mieux définir l'écosystème microbien naturel du *Darfiyeh*.

L'objectif de constituer une collection de souches, une culture des micro-organismes sur milieux sélectifs, suivie d'une identification jusqu'au niveau du genre et/ou de l'espèce de tous les échantillons de *Darfiyeh* à tous les stades de l'affinage, serait utile pour compléter nos travaux exploratoires dans ce domaine. L'identification doit être poursuivie et étendue sur des échantillons de *Darfiyeh* dans une zone de production différente de celle qui a fait l'objet de notre travail. Il faut rappeler ici que la constitution de collections de souches pour envisager la conservation de la diversité biologique de la flore lactique des fromages caprins libanais traditionnels fait partie d'un projet du CNRS du Liban.

Dans une troisième étape, nous avons caractérisé des fragments de peau de chèvre issus des *Dariff* de chaque production de *Darfiyeh*, du point de vue microbiologique, physico-chimique et qualitatif. Il s'est avéré que les conditions d'affinage du *Darfiyeh* (une température de 10-12 °C et une humidité relative de 85-95 %), ainsi que le salage externe des *Dariff* effectué périodiquement pendant l'affinage, ont pu préserver la peau de chèvre contre les attaques microbiennes durant toute la période d'affinage.

Afin de mieux comprendre comment s'établissent les conditions de l'affinage du *Darfiyeh* dans sa peau de chèvre, nous avons opté pour une simulation de celui-ci dans son enceinte naturelle d'affinage. A cet effet, nous avons suivi le transfert éventuel de trois molécules modèles dans un système solution simulée de *Darfiyeh*/peau de chèvre/environnement extérieur.

Les tests de perméabilité et d'absorption des molécules modèles dans le système simulé de *Darfiyeh*/peau nous ont permis d'évaluer leur transfert à travers la peau à 20, 40 et 60 jours d'exposition. Après 20 j d'exposition, la perméabilité des molécules modèles à travers la peau est favorisée aux dépens de leur absorption. Cette propriété dépend de la nature des molécules testées. Après 40 j, les molécules modèles sont absorbées par la peau, alors que la perméabilité s'effondre jusqu'à devenir nulle. Le temps d'exposition, l'épaisseur de la peau, et les paramètres de solubilité de ces molécules expliquent leur comportement. Après 60 j, les molécules modèles, toujours régies par leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que par l'augmentation de la durée d'exposition, ont tendance à migrer depuis la peau vers la solution simulée de *Darfiyeh*. Autrement dit, on peut considérer le transfert de ces molécules modèles dans le système solution simulée de *Darfiyeh*/peau comme étant de nature cyclique. Cela signifie que le système réel est probablement beaucoup plus complexe.

Bien entendu, le modèle très simple développé dans ce travail ne constitue qu'un premier pas vers la prévision du transfert éventuel de composés volatils à travers la peau de chèvre. Notre approche expérimentale pourrait s'approfondir par le choix de la composition simulée de *Darfiyeh* incorporant de la matière grasse. La présence de matière grasse dans la composition simulée de *Darfiyeh*, incluant les constituant majeurs de la fraction volatile du fromage et que nous avons identifiées (3-méthyl butanal, 1-phényl éthanol et 1-octanol) constituerait un modèle de simulation plus approprié. De plus, une étude de la composition et de la texture de la peau s'avère intéressante. La migration de certains composés depuis la peau de chèvre vers l'aliment est sans aucun doute à traiter, dans un système de transfert complexe d'une solution simulée de *Darfiyeh*/peau.

La solution simulée de *Darfiyeh* est constituée des trois molécules modèles à volume égal ; une augmentation de la concentration de ces molécules dans la solution simulée de *Darfiyeh* pourrait apporter des informations complémentaires sur leur comportement vis-à-vis de la peau de chèvre.

Au cours de cette thèse, les approches expérimentales ont touché à différents axes. Nous avons conscience de la modeste part de cette contribution, mais elle n'est que le début d'un travail de longue haleine. Certaines thématiques de recherche abordées dans ce travail, notamment le domaine de l'écologie microbienne, encore très limitée au Liban, pourraient être le point de

départ de certains objectifs, fixés par la FSA. Récemment, des équipements spécialisés, dédiés à la recherche dans le domaine de la biologie moléculaire, ont été mis en place dans les laboratoires de la FSA.

Une contribution scientifique et technique au secteur de la valorisation durable de la tradition fromagère libanaise, encore marquée par un faible contenu, mais à fort potentiel de protection de notre patrimoine culturel, est en relation étroite avec une structure d'appui telle que le Laboratoire de Science et Génie Alimentaires de l'ENSAIA et son homologue au Liban.

6. Références bibliographiques

6. Références bibliographiques

- Abi Saab, S., Sleiman, F.T., Nassar, K.H., Chemaly, I., El skaff, R., 1997. Implication of low and high protein levels on puberty and sexual maturity of growing male goat kids. *Small Ruminant Research*, 25: 17-22.
- Adler-Nissen, J., 1986. Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Elsevier Applied Science, London & New York*.
- Alais, C., 1984. Science du lait: principes des techniques laitières (4ème édition). *Paris: SEPAIC*, 814.
- Albisinni, F., Venzi, L., 2000. The origin, typicality and quality of agro-food products: the territory as input for the enterprise. Actes et Communications - Institut National de la Recherche Agronomique. *Economie et Sociologie Rurales*, 17: 215-223.
- Alonso-Calleja, C., Carballo, J., Capita, R., Beranrdo, A., Garcia-Lopez, M.L., 2002. Changes in the microflora of Valdeteja raw goat's milk cheese throughout manufacturing and ripening. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35: 222-232.
- AOAC, Official Methods of Analysis, 1997. 15th ed., Association of Official Analytical Chemistry, Washington, D.C.
- Arenas, R., Gonzales, L. Bernardo, A., Fresna, J.M., Tornadijo, M.E., 2004. Microbiological and physico-chemical changes in Grenostoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening. *Food Control*, 15: 271-279.
- Arthur, C.L., Pawliszyn, J., 1990. Solid phase micro extraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62: 2145-2148.
- Axelsson, L. T., 1993. Lactic acid bacteria: Classification and physiology in lactic acid bacteria. In S. Salminen & A. von Wright (Eds.). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- Bailey, D.G., 1997. Evergreen hide market ready. *The Leather Manufacturer*, 115: 22-26.
- Bailey, D.G., Gosselin, J.A., 1996. The preservation of animal hides and skins with potassium chloride. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 91: 317-333.
- Banks, J. M., Brechany, E. Y., Christie, W. W., 1992. Volatile components in steam distillates of Cheddar cheese as indicator indices of cheese maturity, flavour and odour. *Food Research International*, 25: 365-373.
- Bellesia, F., Pinetti, A., Pagnoni, U., Rinaldi, R., Zucchi, C., Caglioti, L., Palyi, G., 2003. Volatile components of Grana Parmigiano-Reggiano type hardcheese. *Food Chemistry*, 83: 55-61.
- Berard, J., Bianchi, F., Careri, M., Chatel, A., Mangia, A., Musci, M., 2007. Characterization of the volatile fraction and of free fatty acids of "Fontina Valle d'Aosta", a protected designation of origin Italian cheese. *Food Chemistry*, 105: 293-300.

- Beresford, T., Williams, A., 2004. The microbiology of ripening: Cheese, chemistry, physics and microbiology. 287p.
- Beresford, T.P., Fitzimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11: 259–274.
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Dubernet, S., Guéguen, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126 (3): 278-285.
- BIS (Bureau of Indian Standard) Standard, 1971. Chemical testing of leather : 2-80.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G.D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A., Hols, P., 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature Biotechnology*, 22: 1554–1558.
- Bosset, J.O., Gauch, R., 1993. Comparison of the volatile flavour compounds of six European "AOC" cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. *International Dairy Journal*, 3: 359-377.
- Bouton, Y., Guyot, P., Grappin, R., 1998. Preliminary characterization of microflora of Comté cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 123–131.
- Bowes, J. H., Raistrick, A.S., 1967. The action of heat and moisture on leather. Part VI: Degradation of the collagen. *Journal of American Leather Chemists Association*, 62: 240–57.
- Boyazoglu, J., Morand-Fehr, P., 2001. Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality. A critical review. *Small Ruminant Research*, 40: 1-11.
- Branlard, J. P., 1995. La reconnaissance et la protection par le Droit des mentions d'origine géographique comme élément de qualité des produits alimentaires. *Revue de Droit Rural*, 409.
- Buchin, S., Delague, V., Duboz, G., Berdague, J.L., Beuvier, E., Pochet, S., Grappin, R., 1998. Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavor characteristics of a semi-hard cheese. *Journal of Dairy Science*, 81: 3097-3108.
- Buffa, M., Guamis, B., Saldo, J., Trujillo, A.J., 2004. Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurized, or high-pressure-treated goats' milk. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 37: 247-253.
- Butzke, C.E., Scheide, K., Misselborn, K., 1992. Zur Acroleinbildung in deutschen Brennereien. *Branntweinwirtschaft*, 132: 27-30.
- Cabezas, L., Sanchez, I., Poveda, J.M., Sesena, S., Palop, M.L.L., 2007. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control*, 18: 11-17.

- Cailliez-Grimal, C., Miguindou-Mabiala, R., Leseine, M., Revol-Junelles A.M., Milliere, J.B., 2005. Quantitative polymerase chain reaction used for the rapid detection of *Carnobacterium* species from French soft cheeses. *FEMS Microbiology Letters*, 250: 163-169.
- Califano, A. N., Bevilacqua, A. E., 2000. Multivariate analysis of the organic acids content of Gouda type cheese during ripening. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13 (6): 949–960.
- Callon, C., Duthoit, F., Millet, L., Montel, M.C., 2001. Les Leuconostocs: flore lactique caractéristique du fromage d'AOC Salers au lait cru. Affiche ECO10. 11^e Réunion du Club des bactéries lactiques, 14-16 Novembre, Bordeaux.
- Calvo, M.V., Castillo, I., Diaz-Barcos, V., Requena, T., Fontecha, J., 2007. Effect of a hygienized rennet paste and a defined strain starter on proteolysis, texture and sensory properties of semi-hard goat cheese. *Food Chemistry*, 102: 917-924.
- Caner, C., 2004. Development of a Liquid Extraction Method and comparison with dynamic thermal stripping–thermal desorption (DTS–TD) method: Sorption of D-Limonene by flexible packaging films. *Packaging Technology and Science*, 17: 105–111.
- Carballo, J., Fresno, J.M., Tuero, J.R., Prieto, J.G., Bernardo, A., Martin-Sármineto, R., 1994. Characterization and biochemical changes during the ripening of a Spanish hard goat cheese. *Food Chemistry*, 49: 77-82.
- Carbonell, M., Nunez, M., Fernandez-Garcia, E., 2002. Seasonal variation of volatile compounds in ewe raw milk La Serena cheese. *Le Lait*, 82: 699–711.
- Carretero, C, Mor-Mur, M., Pla, R., Guamis, B., 1992. Caracterización físico-química del queso de leche de cabra Cendrat del Montsec. *Rev. Españ Lecheria*, 36: 28-33.
- Castillo, I., Calvo, M.V., Alonso, L., Juarez, M., Fontecha, J., 2007. Changes in lipolysis and volatile fraction of a goat cheese manufactured employing a hygienized rennet paste and a defined strain starter. *Food Chemistry*, 100: 590–598
- Cayot, N., Dury-Brun, C., Karbowiak, T., Savary, G., Voilley, A., 2008. Measurement of transport phenomena of volatile compounds: A review. *Food Research International*, 41: 349-362.
- Centeno, J. A., Tomillo, F. J., Fernandez-Garcia, E., Gaya, P., Nunez, M., 2002. Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and sensory characteristics of ewes' raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 85: 3164–3172.
- Chamba, J.F., Irlinger, F., 2004. Secondary and adjunct cultures. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese, chemistry, physics and microbiology, General Aspects*, vol. 1. *Elsevier Academic Press, London*, 191–206.
- Charara, Z.N., Williams, J.W., Schmidt, R.H., Marshall, M.R., 1992. *Journal of Food Science*, 57: 963-972.

- Chavarri, F., Santisteban, A., Virto, M., de Renobles, M., 1998. Alkaline phosphatase, acid phosphatase, lactoperoxidase, and lipoprotein lipase activities in industrial ewe's milk and cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2926–2932.
- Cheng, S., McCleskey, F. K., Gress, M. J., Petroziellio, S., Liu, R., Namdari, H., Beninga, K., Salmen, A., Delvecchio, V., 1997. PCR Assay for identification of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (5):1248–1250.
- Chich, J. F., Marchesseau, K., Gripon, J. C., 1997. Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763: Purification and characterization. *International Dairy Journal*, 7: 169–174.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 217–246.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64: 409–421.
- Cogan, T.M., Rea, M.C., 1996. Artisanal European cheeses, *European Commission*, 9.
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., Wilkinson, M. G., 2003a. Evidence for a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 70: 105–113.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2003b. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13: 841–866.
- Collomb, M., Butikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B., Bosset, J.-O., 2002. Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *International Dairy Journal*, 12: 649–659.
- Conrad Frank, D., Owen, C.M., Patterson, J., 2004. Solid phase micro extraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 37: 139–154.
- Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D., Moschetti, G. 2001., Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 414–420.
- Corroler, D., Desmasures, N., Gueguen, M., 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 91–99.
- Corroler, D., Mangin, I., Desmasures, N., Gueguen, M., 1998. An Ecological study of *Lactococci* isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 (12): 4729–4735.

- Covarrubias-Cervantes, M., Mokbel, I., Champion, D., Joseb, J., Voilley, A., 2004. Saturated vapour pressure of aroma compounds at various temperatures. *Food Chemistry*, 85: 221–229.
- Crow, V.L., Coolbear, T., Gopal, P.K., Martley, F.G., McKay, L.L., Riepe, H., 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal*, 5: 855–875.
- Cruickshank, R., 1965. Determination of bacterial count method. *Medical Microbiology*, 768–769.
- Cruz, J.M., Sanches Silva, A., Sendon Garcia, R., Franz, R., Paseiro Losada, P., 2008. Studies of mass transport of model chemicals from packaging into and within cheeses. *Journal of Food Engineering*, 87: 107–115.
- Darnell, Lodis, Baltimore, 1990. Molecular Cell Biology, 2nd ed. *Scientific American Books, New York*, 906–915.
- Dasen, A., Berthier, F., Grappin, R., Williams, A.G., Banks, J., 2003. Genotypic and phenotypic characterization of the dynamics of the lactic acid bacterial population of adjunct-containing Cheddar cheese manufactured from raw and microfiltered pasteurised milk. *Journal of Applied Microbiology*, 94 (4): 595–607.
- De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R., Gobetti, M., 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2011–2020.
- De la Fuente, M.A., Fontecha, J., Juarez, M., 1993. Fatty acid composition of the triglyceride and free fatty acid fractions in different cow's, ewe's and goat's milk cheeses. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und-Forschung*, 196: 155–158.
- De Llano, D., Ramos, M., Rodriguez, A., Montilla, A., Juarez, M., 1992. Microbiological and physicochemical characteristics of Gamonedo blue cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 2: 121–135.
- De Man, J.M., 1990. Principles of food chemistry. *New York: Van Nostrand Reinhold*.
- Deckelbaum, R. J., Hamilton, J. A., Moser, A., Bengtsson-Olivecrona, G., Butbul, E., Carpentier, Y. A., Gutman, A., Olivecrona, T., 1990. Medium-chain versus long chain triacylglycerol emulsion hydrolysis by lipoprotein lipase and hepatic lipase: *Implications for the mechanisms of lipase action*. *Biochemistry*, 29: 1136–1142.
- Deeth, H. C., Touch, V., 2000. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55: 153–168.
- Dekker, M., Van Willige, R.W.G., Linssen, J.P.H., Voragen, A.G.J., 2003. Modelling the effect of oil/fat content in food systems on flavour absorption by LLDPE. *Food Additives and Contaminants*, 20 (2): 180–185.

- Delassus, P. T., 1997. Barrier polymers. The wiley encyclopedia of packaging technology, edited by A. L, Brody and K. S, Marsh. *New York: John wiley & Sons, Inc.*, 71-77.
- Délérís, I., Atlan, S., Souchon, I., Marin, M., Cristian Trelea, I., 2008. An experimental device to determine the apparent diffusivities of aroma compounds. *Journal of Food Engineering*, 85: 232–242.
- Delgado, S., Mayo, B., 2004. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 309– 319.
- Dib, B., 2006. Histoire du Liban, Origines au XXe siècle. ISBN 2848760737, *Broché*, Ed., 108 p.
- Downey, W.K., 1980. Review of the progress of Dairy Science: flavour impairment from pre- and post- manufacture lipolysis in milk and dairy products. *Journal of Dairy Research*, 47: 237-252.
- Dubernet, S., N. Desmasures, Gueguen, M., 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 214(2): 271-275.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A., Ogier, J.C., 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (4): 1248-1255.
- Dubeuf, J.P., Morand-Fehr, P., Rubino, R., 2004. Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Ruminant Research* , 51: 165-173.
- Dubeuf, J.P., Lepidi, V., 2003. Fromages traditionnels au lait de brebis et de chèvres au Liban et perspectives de développement de la filière des petits ruminants. *Rapport de la mission (CIRVAL-FAO)*, 13-20 octobre 2003.
- Dupuis, C., 1994. Activités protéolytiques et lipolytiques des bactéries propioniques laitières. *Thèse de Doctorat, ENSA, Rennes, France*.
- Dury-Brun, C., Chalier, P., Desobry, S., Voilley, A., 2008a. Properties of treated papers and plastic film influencing ethyl ester transfer. *Journal of Food Engineering*, 88: 114–125.
- Dury-Brun, C., Hirata, Y., Guillard, V., Ducruet, V., Chalier, P., Voilley, A., 2008b. Ethyl hexanoate transfer in paper and plastic food packaging by sorption and permeation experiments. *Journal of Food Engineering*, 89: 217–226.
- Duvivier, S., Turmine, M., Letellier, P., 1998. Solubilité de la β -cyclodextrine dans les mélanges eau – nitrate d'éthylammonium à 25 °C. *Canadian Journal of Chemistry*, 76: 1210-1214.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A., Ogier, J.C., 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (4): 1248-1255.
- El-Soda, M., El-Wahab, H. A., Ezzat, N., Desmazeaud, M. J., Ismail, A., 1986. The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli. II. Detection of esterase system of *Lactobacillus*

helveticus, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Le Lait*, 66: 431–443.

Eppert, I., Valdès-Stauber, N., Götz, H., Busse, M., Scherer, S., 1997. Growth reduction of *Listeria* ssp. caused by undefined industrial red and smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium* lines as evaluated in situ on soft cheese. *Applied and Environmental microbiology*, 63 (12): 4812-4817.

Ertl, P., Rohde, B., Selzer, P., 2000, Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contribution and its application to the prediction of drug transport properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43: 3714-3717.

Fanni, J., 1977. Importance de la contribution de la flore fongique dans l'accumulation du calcium et du phosphore à la surface d'un fromage à pâte molle de type Camembert. *Thèse de Doctorat, INPL, Nancy, France*.

FAO., 1999. Résultats globaux du recensement agricole. Projet "Assistance au recensement agricole" FAO et République Libanaise, *Ministère de l'Agriculture*, 77p.

Fayoux, S., Seuvre, A., Voilley, A., 1997. Aroma transfers in and through plastic packagings: Orange juice and *d*-Limonene. A review. Part II: Overall sorption mechanisms and parameters—a literature survey. *Packaging Technology and Science*, 10: 145–160.

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.

Fontecha, J., Pelaez, C., Juárez, M., Requena, M.T., Gómez C., Ramos, M., 1990. Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *Journal of Dairy Science*, 73: 1150-1157.

Fortina, M. G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A., Manachini, P. L., 2003. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiology*, 20: 397-404.

Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., Guinee, T.P., 2004. Cheese, Chemistry, physics and microbiology. General Aspects. Third edition.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H., 2000. Fundamentals of cheese science. *Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc*.

Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Review International*, 12: 457-509.

Franco, I., Prieto, B., Bernardo, A., Gonzalez Prieto, J., Carballo, J., 2003. Biochemical changes throughout the ripening of a traditional Spanish goat cheese variety (Babia-Laciana). *International Dairy Journal*, 13 (2-3): 221-230.

Franco, I., Prieto, B., Urdiales, R., Fresno, R.B., Carballo, J., 2001. Study of the biochemical changes during ripening of Ahumado de Áliva cheese: a Spanish traditional variety. *Food Chemistry*, 74: 463-469.

- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 105-122.
- Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 47: 1-24.
- Fredericks, M., 1997. Progress in leather conservation. Conference review. *Waac Newsletter*, 29: 2.
- Freger, V., 2004. Swelling and morphology of the skin layer of polyamide composite membranes: an atomic force microscopy study. *Environmental Science Technology*, 38: 31-68.
- French, M.H., 1971. Observations sur la chèvre. Rapport de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.
- Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Carballo, J., Bernardo, A., Gonzalez-Prieto, J., 1997. Proteolytic and lipolytic changes during the ripening of a Spanish craft goat cheese (Armada variety). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75: 148-154.
- Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Carballo, J., Gonzalez Prieto, J., Bernardo, A., 1996. Characterization and biochemical changes during ripening of a Spanish craft goat's cheese (Armada variety). *Food Chemistry*, 55 (3): 225-230.
- Furet, J.-P., Quenee, P., Tailliez, P., 2004. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 97 (2): 197-207.
- Garcia, M.C., Rodriguez, M.J., Barbado, A., Tornadijo, M.E., Carballo, J., 2002. Study of *enterococci* and *micrococci* isolated throughout manufacture and ripening of San Simon cheese. *Food Microbiology*, 19: 23-33.
- Gasson, M., 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic *streptococci* after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology*, 154: 1-9.
- Gatto, V., Rizzotti, L., Torriani, S., 2002. Genetic diversity of lactic acid bacteria strains from Ragusano cheese as evaluated by RAPD-PCR. *Industria del Latte*, 38: 65-68.
- Georgala, A., Moschopoulou, E., Aktypis, A., Massouras, T., Zoidou, E., Kandarakis, I., Anifantakis, E., 2005. Evolution of lipolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Food Chemistry*, 93: 73-80.
- Gilbert, S. G., Miltz, J., Giacini, J. R., 1980. Transport considerations of potential migrants from food packaging materials. *Journal of Food Processing and Preservation*, 4: 27- 49.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of *enterococci* in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 215-222.
- Gomez, R., Fernández-Salguero, J., Sanjuán, E., 1991. Caracterización química del queso Palmero. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment*, 31 (2): 187-194.

- Gomez-Ruiz, J.A., Ballesteros, C., González Vinas, M.A., Cabezas, L., Martínez-Castro, I., 2002. Relationship between volatile compounds and odour in Manchego cheese: comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening times. *Le Lait*, 82: 613-628.
- Goudjil, H., Fontecha, J., Luna, P., de la Fuente, M.A., Alonso, L., Juarez, M., 2004. Quantitative characterization of unsaturated and trans fatty acids in ewe's milk fat. *Le Lait*, 84: 473-482.
- Grappin, R., Beuvier, E., 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7: 751-761.
- Gravier, N., Pinotti, A., Califano, A., Zaritzky, N., 2006. Diffusion of sodium chloride in pork tissue. *Journal of Food Engineering*, 77: 910-918.
- Gripon, J.C., 1993. Mould ripened cheeses. In P.F. Fox (Ed.) (2nd ed. Cheese: Chemistry, physics and microbiology. London: Chapman & Hall, 2: 111-136.
- Guichard, E., 2002. Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International*, 18: 49-70.
- Güven, M., Konar, A., Kleeberger, A., 1995. Microbiological qualities of Tulum cheeses made from cow, ewe and goat milk and packaged and ripened in goat skin bags. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 19 (4): 293-298.
- Haenlein, G.F.W., Wendorff, W.L., 2006. Sheep milk-production and utilization of sheep milk. In: Park, Y.W., Haenlein, G.F.W. (Eds.). Handbook of milk of non bovine mammals. Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK, and Ames, Iowa, USA, 137-194.
- Haenlein, G.F.W., Caccese, R., 1984. Goat milk versus cow milk. In: Haenlein, G.F.W., Ace, D.L. (Eds.). Extension Goat Handbook, USDA Publ., Washington, DC, p.1-E-1.
- Hajj, E., 1999. Enquête sur l'élevage caprin au Liban. *Réussir la chèvre*, 230: 37-40.
- Halek, G. W., Chan, A., 1994. Partitioning and absolute flavour threshold interactions of aliphatic food packaging solvent homologs in high-fat cookies. *Journal of Food Science*, 59: 420-423.
- Hansch, C., Leo, A.J., 1979. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology (New York: Wiley).
- Hansen, E.F., Lee, S.N., Sobel, H., 1992. The effects of relative humidity on some physical properties of modern vellum. *Journal of the American Institute for conservation*, 31 (3): 325 – 342.
- Hansen, C. M., 1967. The three dimensional solubility parameter-key to paint component affinities. *Journal of Paint technology*, 39: 104-117.
- Hayaloglu, A.A., Güven, M., Fox, P.F., 2002. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish white cheese Beyaz Penir. *International Dairy Journal*, 12: 635-648.

- Herreros, M.A., Fresno, J.M., Gonzalez Prieto, M.J., Tornadijo, M.E., 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *International Dairy Journal*, 13 (6): 469–479.
- Holko, I., Bisova, T., Holkova, Z., Kmet, V. 2006. Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. *Food Control*, 17: 393–396.
- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Dusko Ehrlich, S., Guedon, E., Monnet, V., Renault, P., Kleerebezem, M., 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 435–463.
- Holst, P.J., 2003. Australian goat leather. Agfact A7.8.7, 2nd edition. Edited by Janet Healey, Division of Agricultural Sciences ISSN 0725-7759.
- Hosri, Ch., El Khoury, N., 2004. Valoriser le fromage de chèvre traditionnel « Darfiyeh » pour aider au développement de la région montagnarde nord libanaise. *Options méditerranéennes, Série A*, 61: 201-206.
- Hosri, Ch., 2003. Effet de l'incorporation d'enveloppes de sésame et de brisures de lentilles dans la ration sur la production et la composition du lait de chèvre au Liban. *Thèse de Doctorat, INPL, Nancy, France*.
- Hughes IR., 1974. Temporary preservation of hides using boric acid. *Journal of Society Leather Trade Chemists*, 58: 100-103.
- Husson-Kao, C., Mengaud, J., Cesselin, B., van Sinderen, D., Benbadis, L., Chapot-Chartier, M.P., 2000. The *streptococcus thermophilus* autolytic phenotype results from a leaky prophage. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 558-565.
- Ikegami, T., Nagashima, K., Shimoda, M., Tanaka, Y., Osajima, Y., 1991, Sorption of volatile compounds in aqueous solution by ethylene-vinyl alcohol copolymer films. *Journal of Food Science*, 56: 500-509.
- Institut de l'Élevage Français, Ministère des Affaires Etrangères et Ambassade de France à Beyrouth. 2003. Les filières lait et viande de ruminants au Liban, compte-rendu d'étude.
- Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P., Brulé, G., 2007. Science des aliments, vol 2, Technologie des produits alimentaires : emballage, p.423.
- Jenness, R., Shipe, W.F., Sherbon, J.W., 1974. In: Sebb, B.H. Johnson, A.H., Alford, J.A. (Eds.), *Fundamentals of Dairy Chemistry*, A.V. Publishing Co., Westport, 402.
- Johansson, F., 1993. Polymer packages for food-materials, concepts and interactions, a literature review (Göteborg: SIK- The Swedish Institute for Food and Biotechnology), 118.
- Jouquand, C., Ducruet, V., Giampaoli, P., 2004, Partition coefficients of aroma compounds in polysaccharide solutions by the phase ratio variation method. *Food Chemistry*, 85: 467-474.

- Juarez, M., Ramos, M., 1986. Physico-chemical characteristics of goat milk as distinct from those of cow milk. In: *International Dairy Federation (Ed.), Proceedings of the IDF Seminar Production and Utilization of Ewe's and Goat's milk, Bulletin N0. 202, Athens, Greece, 54-67.*
- Kaminarides, S., Stamou, P., Massouras, T., 2007. Changes of organic acids, volatile aroma compounds and sensory characteristics of Halloumi cheese kept in brine. *Food Chemistry*, 100: 219-225.
- Kanagaraj, J., John Sundar, V., Muralidharan, C., Sadulla, S., 2005a. Alternatives to sodium chloride in prevention of skin protein degradation-a case study. *Journal of Cleaner Production*, 13: 825-831.
- Kanagaraja, J., Sastryb, T.P., Rose, C., 2005b. Effective preservation of raw goat skins for the reduction of total dissolved solids. *Journal of Cleaner Production*, 13: 959-964.
- Kanagaraj, J., Chandra babu, N.K., 2002. Alternatives to salt curing techniques. Review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 61: 339-348
- Kanagaraj, J., Chandra Babu, N.K., Sadulla, S., Suseela Rajkumar, G., Visalakshi, V., Chandra Kumar, N., 2001. Cleaner techniques for the preservation of raw goat skins. *Journal of Cleaner Production*, 9: 261-268.
- Kawabata, S., Vassal, L., Le Bars, D., Cesselin, B., Nardi, M., Gripon, J. C., Chapot-Chartier, M. P., 1997. Phage-induced lysis of *Lactococcus lactis* during Saint-Paulin cheese ripening and its impact on proteolysis. *Le lait*, 77 (2): 229-239.
- Kazar, R., Pitchaimani, R., 2006. Formulation of transdermal drug delivery system: matrix type, and selection of polymer-their evaluation. *Current Drug Discovery Technology*, 3(4): 279-85.
- Kinsella, J. E., Hwang, D. H., 1976. Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavour. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8: 191-228.
- Kniff, E., Dellaglio, F., Lombardi, A., Andrighetto, C., Torriani, S., 2001. Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. *Journal of Microbiological Methods*, 47: 35-40.
- Larrayoz, P., Addis, M., Gauch, R., Bosset, J. O., 2001. Comparison of dynamic headspace and simultaneous distillation extraction techniques used for the analysis of the volatile components in the three European PDO ewe's milk cheeses. *International Dairy Journal*, 11: 911-926.
- LeDoux, M., Rouzeau, A., Bas, P., Sauvant, D., 2002. Occurrence of trans-C18:1 fatty acid isomers in goat milk: effect of two dietary regimens. *Journal of Dairy Science*, 85: 190-197.
- LégiFrance, Journal Officiel de La République Française, N⁰174, 29 Juillet 2000.
- Leipzig, 1996. Liban : Rapport du pays pour la conférence technique internationale de la FAO sur les ressources phytogénétiques, 23 p (page 6).

- Le Mens, P., 2006. Le goût et l'affinage des fromages. La biogenèse des arômes pendant l'affinage des fromages: " de la biodiversité microbiologique à la diversité des arômes". LOF Newsletter, N°5, North East South West INTERREG IIIC.
- Leveau, J.Y., Bouix, M., 1993. Les levures. In Microbiologie industrielle. Les Micro-organismes d'intérêt industriel. *Collection Sciences et techniques Agro-alimentaires, Tech et Doc Lavoisier, Paris*, 2: 93.
- Licitra, G., Ogier, J.C., Parayre, S., Pediliggieri, C., Carnemolla, T.M., Falentin, H., Madec, M.N., Carpino, S., Lortal, S., 2007. Variability of the bacterial biofilms of the "Tina" wood vat used in the Ragusano cheese making process. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (21): 6980-6987.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., 1993. Effect of type of lactic starter on microbiological, chemical and sensory characteristics of Feta cheese. *Food Microbiology*, 10: 31– 41.
- Liu, S-Q., Holland, R., Crow, V. L., 2001. Purification and properties of intracellular esterases from *Streptococcus thermophilus*. *International Dairy Journal*, 11: 27–35.
- Lombardi, A., Gatti, M., Rizzotti, L., Torriani, S., Andrighetto, C., Giraffa, G., 2004. Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian raw milk cheeses. *International Dairy Journal*, 14: 967–976.
- Lopez-Carballo, G., Cava, D., Lagaron, J.M., Catala, R.N., Gavara, R., 2005. Characterization of the interaction between two food aroma components, r-pinene and ethyl butyrate, and ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) packaging films as a function of environmental humidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7212-7216.
- Lucey, J.A., Corry, C., Fox, P.F., 1993. Changes in the acid-base buffering curves during the ripening of Emmental cheese. *Milchwissenschaft*, 48: 183-186.
- Luikart G, Gielly L, Excoffier L, Vigne J-D, Bouvet J, Taberlet P., 2001. Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 5927-5932.
- Luykx, D., van Ruth, S.M., 2008. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107: 897–911.
- Mallatou, M., Pappa, E., Massouras, T., 2003. Changes in free fatty acids during ripening of Teleme cheese made with ewes', goats', cows' or a mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal*, 13: 211-219.
- Mallia, S., Fernandez-Garcia, E., Bosset, O. J., 2005. Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses. *International Dairy Journal*, 15: 741–758.
- Mannu, L., Paba, A., Comunian, R., Daga, E. 2002. Biodiversity in home-made and industrial varieties of Protected Designation of Origin Pecorino Sardo ewe's milk cheese. Poster in Congrilaite 26th IDF World Dairy Congress, Paris, 24-28 September.

- Mannu, L., Paba, A., Pes, M., Scintu, M.F., 2000a. Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 191–197.
- Mannu, L., Comunian, R., Scintu, M.F., 2000b. Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 10: 383–389.
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I.G., Anifantakis, E.M., 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 153–161.
- Maoz, R., Mayr, R., Scherer, S., 2003. Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. *Applied and Environmental microbiology*, 69 (7): 4012–4018.
- Marilley, L., Casey, M.G., 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 139–159.
- Marino, M., Maifreni, M., Rondinini, G., 2003. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 229: 133–140.
- Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Gonzalez, J., Rebollo, J.E., Caceres, P., 2002. Ibore goat's milk cheese: microbiological and physico-chemical changes throughout ripening. *Le Lait*, 82: 579–587.
- Mathot, A.G., Beliard, E., Thuault, D., 2003. *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. *Journal of Dairy Science*, 86: 3068–3074.
- McSweeney, P. L. H., Sousa, M. J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80: 293–324.
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Lucey, J.A., Jordan, K.N., Cogan, T.M., 1993. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 3: 613–634.
- Medina, M., Gaya, P., Nuñez, M., 1992. Cremos goat's milk cheese: microbiological and chemical changes throughout ripening. *Journal of Dairy Research*, 59: 563–566.
- Michaylova, M., Isawa, K., Vlachkova, L., 2002. Study on yogurt bacteria isolated from plants in Bulgaria. Book of Abstracts of the 7th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, The Netherlands, p. A 40.
- Michel, V., Verdier-Metz, I., Delbès, C., Chamba, J.F., Montel, M.C., 2005. Diversité microbienne des laits crus: quels enjeux, quels risques, quels moyens de gestion ? Colloque INRA-INAO Novembre 2005.

- Michel, V., Hauwuy, A., Chamba, J.F., 2001. La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Le Lait*, 81: 575-592.
- Mirhosseini, H., Salmah, Y., Nazimah, S.A.H., Tan, C.P., 2007. A solid-phase micro extraction for headspace analysis of key volatile compounds in orange beverage emulsion. *Food Chemistry* 105: 1659-1670.
- Moellering, R.C., 1995. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. In: Mandell, G.L., Bennet, J.E., Eolin, R. (Eds.), *Principles and practice of infectious diseases*, Livingstone, New York, pp. 1826-1835.
- Molimard, P., Spinnler, H. E., 1996. Review: Compounds involved in the flavour of surface mould-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79: 169–184.
- Monnet, C., Correia, K., Sarthou, A.S., Irlinger, F., 2006. Quantitative detection of *Corynebacterium casei* in cheese by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (11): 6972-6979.
- Montanari, M., 1994. The culture of food. Oxford: *Blackwell*.
- Moreau M.C., Vuitton D., 2002. Le fromage et les bénéfices du vivant en matière de santé: améliorations des défenses immunitaires. *Congrilait*, 2002.
- Morgan, S., Ross, R.P., Hill, C., 1997. Increased starter cell lysis in Cheddar cheese using a bacteriocin –producing adjunct culture. *Journal of Dairy Science*, 80: 1-10.
- Morgan, F., Bodin, J.P., Gaborit, P., 2001. Lien entre le niveau de lipolyse du lait de chèvre et la qualité sensorielle des fromages au lait cru ou pasteurisé. *Le Lait*, 81: 743-756.
- Morris, H.A., Guinee, T.P., Fox, P.F., 1985. Salt diffusion in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 68: 1851-1858.
- Mout, L., 2004. Geographical indicated products in The Netherlands. Ph.D. thesis, Wageningen, The Netherlands.
- Mujiburohman, M., Feng, X. 2007. Permselectivity, solubility and diffusivity of propyl propionate/water mixtures in poly(ether block amide) membranes. *Journal of Membrane Science*, 300: 95–103
- Mulder, H., 1952. Taste and flavour forming substances in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 6: 157–168.
- Mundt, J.O., *Enterococci*, In: Butler J.P. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol.2, Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 1986, pp. 1063-1065.
- Najera, A.I., Barron, L.J.R., Barcina, Y., 1993. Review: lipid fraction composition of cows, sheeps and goats cheese, and the influence on its quality. *Revista Espanola de Ciencia y Tecnologia de Alimentos*, 33 (4): 345-363.

- Nelson, J. H., Jensen, R. G., Pitas, R. E., 1977. Pregastricesterase and other oral lipases-a review. *Journal of Dairy Science*, 60: 327–362.
- Nielsen, T. J., Jägerstad, I. M., 1994. Flavour scalping by food packaging. *Trends in food Science and Technology*, 5: 353-356.
- Nielsen, T. J., Jägerstad, I.M., Öste, R.E., Wesslén, B. O., 1992a. Comparative absorption of low molecular aroma compounds into commonly used food packaging polymer films. *Journal of Food Science*, 57: 490-492.
- Nielsen, T. J., Jägerstad, I.M., Öste, R.E., 1992b. Study of factors affecting the absorption of aroma compounds into low-density polyethylene. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60: 377-381.
- Nieuwenhuizen, L., 1998. Synthetic fill materials for skin, leather, and furs. *Journal of the American Institute for conservation*, 37 (1): 135 – 145.
- Nilsson, M., tragardh, G., Ostergren, K., 2006. The influence of sodium chloride on mass transfer in a polyamide nanofiltration at elevated temperatures. *Journal of Membrane Science*, 208: 928-936.
- Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A., 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (8): 3691-3701.
- Overington, A., Wonga, M., Harrisonb, J., Ferreira, L., 2008. Concentration of dairy flavour compounds using pervaporation. *International Dairy Journal*, 18: 835-848.
- Panseri, S., Giani, I., Mentasti, T., Bellagamba, F., Caprino, F., Moretti, V.M., 2008. Determination of flavour compounds in a mountain cheese by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *LWT*, 41: 185-192.
- Park, Y.W., Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W., 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68: 88-113.
- Park, Y.W., 2006. Goat milk-chemistry and nutrition. In: Park, Y.W., Haenlein, G.F.W. (Eds.). *Handbook of milk of non bovine mammals. Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK/Ames, Iowa, USA*, 34-58.
- Park, Y.W., 2001. Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 84: 84-92.
- Partidario, A.M., Barbosa, M., Vilas Boas, L., 1998. Free fatty acids, triglycerides and volatile compounds in Serra da Estrela cheese - changes throughout ripening. *International Dairy Journal*, 8: 873-881.
- Pavia, M., Trujillo, A.J., Guamis, B., Ferragut, V., 2000. Effectiveness of high-pressure brining of Manchego-type cheese. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 33: 401-403.

- Pavia, M., Guamis, B., Trujillo, A.J., Capellas, M., Ferragut, V., 1999. Changes in microstructural, textural and colour characteristics during ripening of Manchego-type cheeses salted by brine vacuum impregnation. *International Dairy Journal*, 9: 91-98.
- Perez-Juan, M., Flores, M., Toldra, F., 2007. Effect of ionic strength of different salts on the binding of volatile compounds to porcine soluble protein extracts in model systems. *Food Research International*, 40: 687–693.
- Perez, G., Cardell, E., Zarate, V., 2002. Random amplified polymorphic DNA analysis for differentiation of *Leucocostoc mesenteroides* subspecies isolated from Tenerife cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 82-85.
- Perotti, M.C., Bernal, S.M., Meinardi, C.A, Zalazar, C.A., 2005. Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters. *International Dairy Journal*, 15: 1150–1155.
- Piatkiewicz, A., 1987. Lipase and esterase formation by mutants of lactic acid *streptococci* and *lactobacilli*. *Milchwissenschaft*, 42: 561–564.
- Pico. Y., Font, G., Moltó., J.C., Mañes, J., 2000. Solid- phase extraction of quaternary ammonium herbicides. *Review, Journal of Chromatography A*, 885: 251-271.
- Pillonel, L., Bosset, J.O., Tabacchi, R., 2002. Rapid Preconcentration and Enrichment Techniques for the Analysis of Food Volatile. A Review. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35: 1-14.
- Pinho, O., Peres, C., Ferreira, I.M.P.L.V.O., 2003. Solid-phase micro extraction of volatile compounds in “Terrincho” ewe cheese-Comparison of different fibers. *Journal of Chromatography A*, 1011: 1-9.
- Pizillo, M., Claps, S., Cifuni, G.F., Fedele, V., Rubino, R., 2005. Effect of goat breed on the sensory, chemical and nutritional characteristics of ricotta cheese. *Livestock Production Science*, 94: 33-40.
- Poll, L., Flink, J. M., 1984. Aroma analysis of apple juice – influence of salt addition on headspace volatile composition as measured by gas chromatography and corresponding sensory evaluations. *Food Chemistry*, 13: 193–207.
- Poznanski, E., Cavazza, A., Cappa, F., Cocconcelli, P.S., 2004. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *International Journal of Food Microbiology*, 92: 141-151.
- Psoni, L., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., 2003. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat’s milk. *Food Microbiology*, 20: 575-582.
- Puhan, Z., Stefen, C., 1967. Studie uK ber die proteolytische Wirkungeiniger mikrobieller Labersatzstoffe auf die Proteine der Milch vomMoment des Einlabens bis zum reifen Kase. *Schweizerische Milchzeitung, Wissenschaftliche Beilage*, 56: 937-952.

- Quezada-Gallo, J.-A., Debeaufort, F., Voilley, A., 2000. Mechanism of aroma transfer through edible and plastic packagings: Are they complementary to solve the problem of aroma transfer? *ACS Symposium Series*, 753 p, pp. 125-140.
- Quezada-Gallo, J.A., Debeaufort, F., Voilley, A., 1999. Interactions between aroma and edible films. 1. Permeability of methylcellulose and low-density polyethylene films to methyl ketones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 108-113.
- Randazzo, C.I., Pitino, I., De Luca, S., Scifo, G.O., Caggia, C., 2008. Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. *International Dairy Journal*, 20, 122(3): 269-78.
- Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., M. De Vos, W., Vaughan, E. E., 2002. Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16SrRNA Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (4): 1882-1892.
- Rebricova, N. L., Solovyova., N.I., 1987. Electron microscopic and biochemical investigation of parchment. *ICOM Committee for Conservation preprints*, 8th Triennial Meeting, Sydney 1197-1200.
- Rekker, R. F., 1977, The hydrophobic fragmental constant (*New York: Elsevier*).
- Reynier, A., Dole, P., Fricoteaux, F., Saillard, F., Feigenbaum, A.E., 2004. Stabilization of aroma compounds through sorption-release by packaging polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5653-5662.
- Sable, S., Portait, V., Letellier, F., Cottenceau, G., 1997. Microbiological changes in a soft raw goat's milk cheese during ripening. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 212-220.
- Sadler, G. D., Braddock, R. J., 1990. Oxygen permeability of low-density polyethylene as a function of limonene absorption: An approach to modelling flavour scalping. *Journal of Food Science*, 55: 587-588.
- Salama, M., Sandine, W.E., Giovannoni, S., 1991. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* ssp. cremoris. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1313-1318.
- Saldo, J., Fernandez, A., Sendra, E., Butz, P., Tauschery, B., Guamis, B., 2003. High pressure treatment decelerates the lipolysis in a caprine cheese. *Food Research International*: 36, 1061-1068.
- Sanz Sampelayo, M.R., Perez, L., Martin Alonso, J.J., Amigo, L., Boza, J., 2002. Effects of concentrates with different contents of protected fat rich in PUFAs on the performance lactating Granadina goats. Part II. Milk production and composition. *Small Ruminant Research*, 43: 141-148.
- Sarantinopoulous, P., Kalantzopoulous, G., Tsakalidou, E., 2002. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 76: 93-105.

- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performances. *International Dairy Journal*, 11: 621-647.
- Scanlan, D. R., Smith, M.A., Isenberg, H.D., Engrassia, S., Hilton, E., 1994. *Clostridium bifermentans* bacteremia with metastatic osteomyelitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 2867-2868.
- Schwartzberg, H.G., Chao, R.Y., 1982. Solute diffusivities in leaching processes. *Food Technology*, 36: 73-86.
- Schwartz, A., Le Blay, G., Blaut, M., 2000. Quantification of different *Eubacterium* spp. in human fecal samples with species-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1): 375-382.
- Serhan, M., Hosri, Ch., Cailliez-Grimal, C., Fanni, J., 2007. Characteristics of Lebanese *Darfiyeh* cheese made from raw goat milk. In: Proceedings of the, CRA/IGA, International Symposium, the quality of goat products: models and tools for evaluation and promotion., International Goat Association, CRA-uze, Bella (PZ) – Italy, 24-26 May 2007, p.66-69.
- Seuvre, A. M., Diaz, M. A., Voilley, A., 2000. Espinosa influence of the food matrix structure on the retention of aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4296-4300.
- Sharpe, M.E., Fryer, T.F., Smith, D.G., 1966. Identification of lactic acid bacteria. In: Gibbs, B.M., Skinner, F.A. (Eds.), Identification Methods for Microbiologists. *Academic Press, London*, pp. 65-79.
- Sherman, J.M., 1937. The streptococci. *Bacteriological Reviews*, 1: 3-97.
- Shimoda, M., Ikegami, T., Osajima, Y., 1988. Sorption of flavour compounds in aqueous solution into polyethylene film. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 42: 157-163.
- Singh, R. P., Heldman, D. R., 1993. Introduction to food engineering (*New York: Academic Press, Inc*), pp.499.
- Skie, S., Ardo, Y., 2000. Influence from raw milk flora on cheese ripening studied by different treatments of milk to model cheese. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 33: 499-505.
- Sobel, H., E.Hansen., 1989. Environmentally produced changes in historic proteins. A: Collagen. Text of poster presented at the Third Annual Symposium of the Protein Society, Seattle, Wash.
- Soryal, K.A., Zeng, S.S., Min, B.R. et Hart, S.P., 2004. Effect of feeding treatments and lactation stages on composition and organoleptic quality of goat milk Domiati cheese. *Small Ruminant Research*, 52: 109-116.
- Strandburg, G., DeLassus, P.T., Howell, B.A., 1990. In Barrier polymers and structures (Koros, W.J., ed.), pp. 333-350, American Chemical Society.
- Strathmann, S., Pastorelli, S., Simoneau, C., 2005. Investigation of the interaction of active packaging material with food aroma compounds. *Sensors and Actuators B*, 106: 83-87.

- Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C., Lanorte, M.T., 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology*, 89: 267-274.
- Takenouchi, K., Kondo, K., Nakamura, K., 1995. Effect of masked chromium complexes in thermal shrinkage stability of collagen. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 79: 188-193.
- Takeuchi, F., Watanabe, S., Baba, T., Yuzawa, H., Ito, T., Morimoto, Y., Kuroda, M., Cui, L., Takahashi, M., Ankai, A., Baba, S., Fukui, S., Lee, J.C., Hiramatsu, K., 2005. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *Journal of Bacteriology*, 187 (21): 7292-7308.
- Tavaria, F.K., Silva Ferreira, A.C., Malcata, F.X., 2004. Volatile Free Fatty Acids as Ripening Indicators for Serra da Estrela Cheese. *Journal of Dairy Science*, 87: 4064-4072.
- Tehrany, E.A., Desobry, S., 2004. Partition coefficients in food/packaging systems: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21 (12): 1186-1202.
- Tehrany, E.A., Desobry, S., 2007. Partition coefficients of migrants in food simulants/polymers systems. *Food Chemistry*, 101 (4): 1714-1718.
- Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Veljovic, K., Ostojic, M., Topisirovic, L., 2007. Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlatar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 114 (1): 36-42.
- Trifunovic, O., Tragardh, G., 2006. Mass transport of aliphatic alcohols and esters through hydrophobic pervaporation membranes. *Separation and Purification Technology*, 50: 51-61.
- Ugarte, M.B., Guglielmotti, D., Giraffa, G., Reinheimer, J., Hynes, E., 2006. Nonstarter lactobacilli isolated from soft and semihard Argentinean cheeses: genetic characterization and resistance to biological barriers. *Journal of Food Protection*, 69 (12): 2983-2991.
- Urbach, G., 1997. The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: Contribution of volatile compounds. *International Journal of Dairy Technology*, 50: 79-89.
- Urbach, G., 1993. Relations between cheese flavour and chemical composition. *International Dairy Journal*, 3: 389-422.
- Vankar, P.S., Dwivedi, A.Kr. 2008. Sulphates for skin preservation-A novel approach to reduce tannery effluent salinity hazards. *Journal of Hazardous Materials, in press*.
- Van Willige, R. W. G., Linssen, J. P. H., Voragen, A. G. J., 2000, Influence of food matrix on absorption of flavour compounds by linear low- density polyethylene: oil and real food products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1790-1797.
- Vlaemynck, G., 1992. Study of lipolytic activities of the lipoprotein lipase in luch cheese of the Gouda type. *Milchwissenschaft*, 47: 164-166.

- Walstra, P., Noomen, A., Geurts, T.J., 1993. Dutch-type varieties. In P.F. Fox (Ed.) (2nd ed. Cheese: Chemistry, physics and microbiology (vol. 2, pp. 39-82). London: Chapman & Hall.
- Wasse, A., 2001. Les chèvres sauvages du Liban: des preuves d'une domestication ancienne ?. Levant ISSN 0075-8914, vol. 33, pp. 21-33, Editor: Council for British Research in the Levant, London, ROYAUME-UNI (1969).
- Weerkamp, A.H., Klijn, N., Neeter, R., Smit, G., 1996. Properties of mesophilic lactic acid bacteria from raw milk and naturally raw milk products. *Neth. Milk Dairy J.*, 50: 319-332.
- Wilkins, D. W., Schmidt, R. H., Shireman, R. B., Smith, K. L., Jezeski, J. J., 1986. Evaluating acetaldehyde synthesis from L-[14C(U)] threonine by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, 69: 1219–1224.
- Yadav, H., Jain, S., Sinha, P.R., 2007. Production of free fatty acids and conjugated linoleic acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. *International Dairy Journal*, 17: 1006–1010.
- Yilmaz, G., Ayar, A., Akin, N., 2005. The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese. *Journal of Food Engineering*, 69 (3): 269-274.
- Yvon, M., Rijnen. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11, 185-201.
- Young, G. S., 1990. Microscopical hydrothermal stability measurements of skin and semi-tanned leather. *ICOM Committee for Conservation preprints, 8th Triennial Meeting, Dresden.*, 19(2): 626–31.
- Ziino, M., Condurso, C., Romeo, V., Giuffrida, D., Verzera, A., 2005. Characterization of “Provola dei Nebrodi”, a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS. *International Dairy Journal*, 15: 585–593.

7. Annexes

7. Annexes

Annexe 1. Illustration des différentes étapes de la préparation de la peau de chèvre



1.a. Fixation de la chèvre par l'une de ses pattes



1.b. Prélèvement délicat de la peau



1.c. Tonte de la peau surtout au niveau du cou



1.d. Nettoyage et salage interne

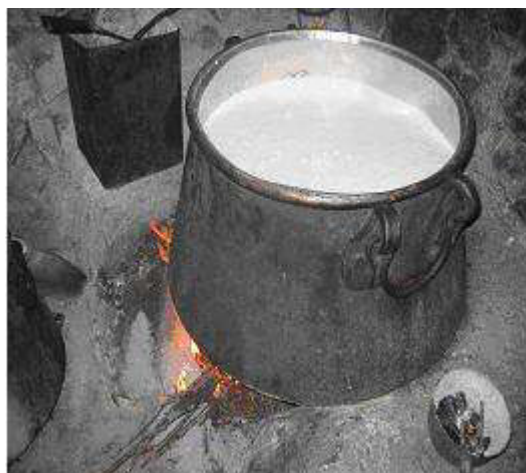


1.e. Fixation des pattes tout en les nouant



1.f. Ouverture de la peau au niveau du cou

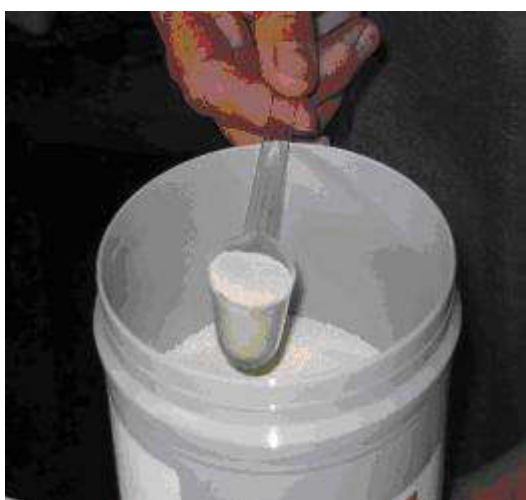
Annexe 2. Illustration des différentes étapes de fabrication du fromage Darfiyeh



2.a. Chauffage du lait jusqu'à 35 °C



2.b. Filtration du lait

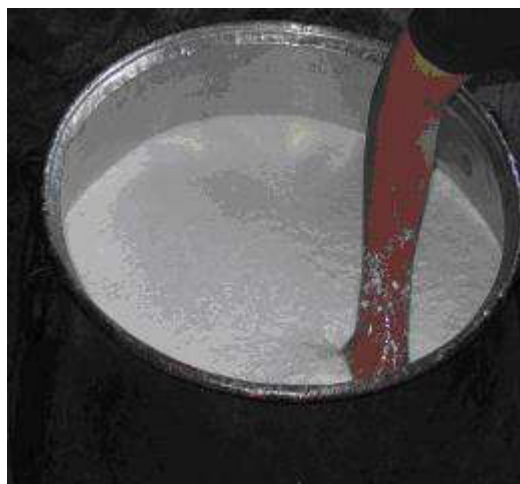


2.c. Ajout de la présure à raison de 1,5 g. 50 Kg⁻¹ lait





2.d. Coagulation du lait
($\theta = 30 - 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 60 - 90\text{ min}$)



2.e. Rupture de la masse du caillé



2.f. Tranchage de la masse du caillé



2.g. Moulage et égouttage

Annexe 3. Illustration de la préparation du fromage de lactosérum ou "Arichi"



3.a. Addition de lait cru au lactosérum



3.b. Chauffage du lactosérum à 90 °C.
et récupération du surnageant

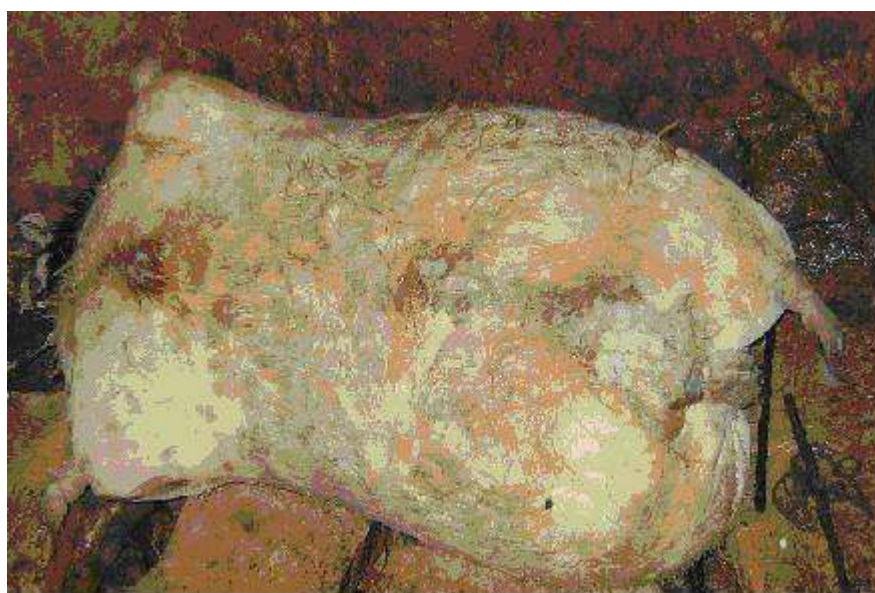


3.c. Salage de l' "Arichi"

Annexe 4. Illustration des conditions d'affinage du Darfiyeh



4.a. Boules de fromage de *Darfiyeh* et de lactosérum alternées dans la peau de chèvre, au niveau du cou



4.b. "*Dariff*" : enceinte d'affinage du *Darfiyeh*

Annexe 5. Standard fournis par SIGMA-Aldrich (France) et utilisés pour l'identification des composés volatils du Darfiyeh

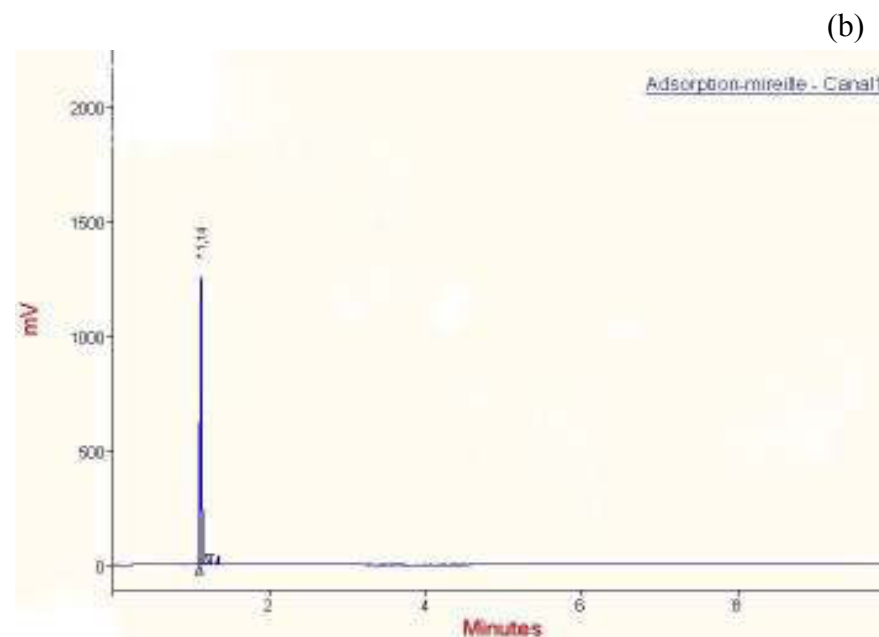
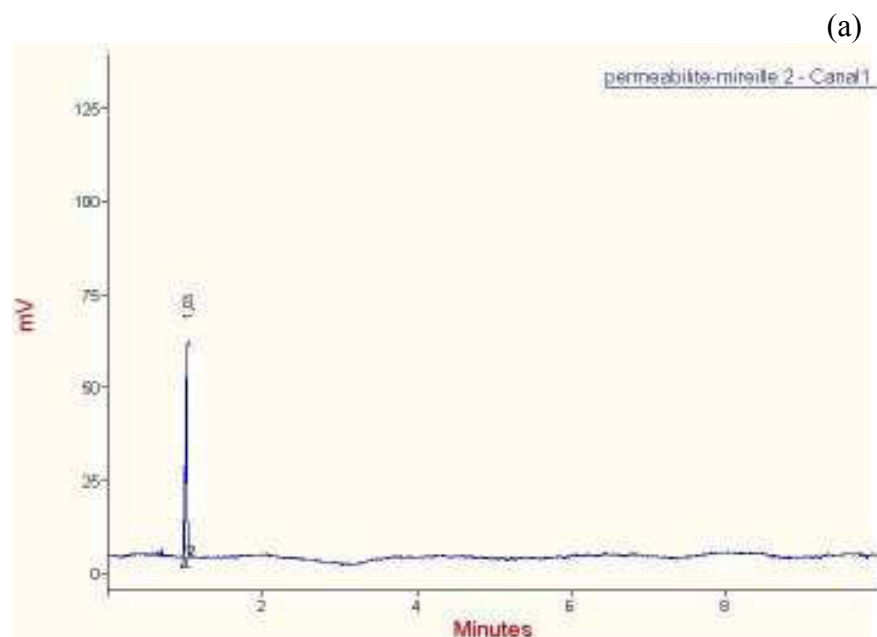
Numéro du pic	Nom du standard	Point d'ébullition (°C)	Temps de rétention (min)	Quantité (µL)	Pureté (%)
1	2-butanone ^a	80	15,15	1	> 99
2	2-propanol ^b	82	15,98	1	> 99
3	3 méthyl butanal ^c	90	16,38	1	> 99
4	2,3-butanedione ^a	88	18,28	1	> 99
5	2-pentanone ^a	102	18,63	1	> 99
6	2-butanol ^b	99,5	19,53	1	> 99
7	1-propanol ^b	97	20,10	1	> 99
8	2-pentanol ^b	118,9	23,06	1	> 99
9	1-butanol ^b	118	24,01	1	> 99
10	3 méthyl butanol ^b	130	26,47	1	> 99
11	2-heptanone ^a	151	26,52	1	> 99
12	2-octanone ^a	173	30,29	1	> 99
13	2-heptanol ^b	160	30,33	1	> 99
14	Octanal ^c	171	30,50	1	> 99
15	1-hexanol ^b	158	31,70	1	> 99
16	2-nonanone ^a	195	33,88	1	> 99
17	1-octanol ^b	194,4	38,26	1	> 99
18	2-undecanone ^a	231	40,52	1	> 99
19	1 phényl éthanol ^b	202,6	49,00	1	> 99

^aComposés appartenant à la famille des *Cétones*,

^bComposés appartenant à la famille des *Alcools*,

^cComposés appartenant à la famille *Aldéhydes*

Annexe 6. Chromatogrammes des tests de perméabilité (a) et d'absorption (b) d'une solution de 99 mL H₂O distillée + 1 mL acétonitrile, après une durée d'exposition de 25 j



Le pic identifié correspond à celui de l'acétonitrile

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Marie-Christine MONTEL, Directeur de Recherche, INRA, Aurillac

**Madame Marie-Caroline MICHALSKI-VEILLEROT, Chargée de Recherche, Faculté de Médecine,
Lyon-Sud, Oullins**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame SERHAN Mireille

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDOEUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Valorisation durable des laits de chèvre de la région du Nord Liban. Transformation
en fromage *Darfiyeh* et établissement de caractéristiques physico-chimiques et
microbiologiques en vue de la création d'une appellation d'origine"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « Procédés biotechnologiques et alimentaires »

Fait à Vandoeuvre, le 27 octobre 2008

Le Président de l'IN.P.L.,

F. LAURENT

