

CHAPITRE IV

Matériel et méthodes

IV.1 Plan général du travail

Ce travail visant, la détermination des qualités physico-chimiques et microbiologiques et l'évaluation de l'aptitude technologique du lait de vache produit dans quelques fermes dans la région de M'sila, est structuré comme suit (figure1) :

- ⇒ Choix et inspection des lieux d'échantillonnage ;
- ⇒ Analyses physico-chimiques des laits ;
- ⇒ Détermination de la qualité hygiénique des laits par les analyses microbiologiques ;
- ⇒ Détermination de l'aptitude à la coagulation et à l'égouttage des laits.

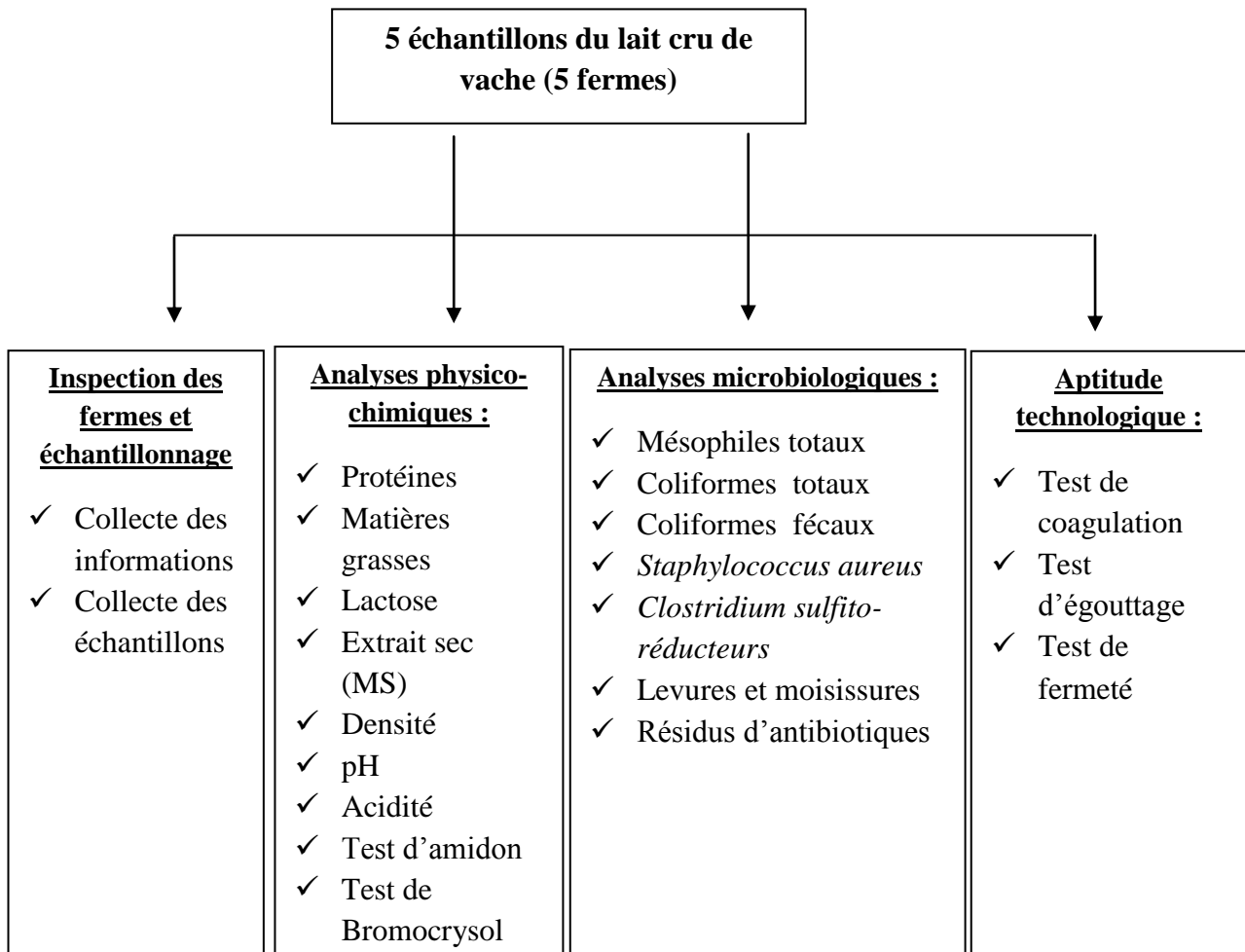


Figure N°1 : Diagramme représentant le protocole expérimental.

IV.2 Choix et inspection des lieux d'échantillonnage

IV.2.1 Lieux d'échantillonnage

Cinq fermes, réparties dans la wilaya de M'sila (commune Boussaâda) (figure 2 et tableau 10), ont été visitées en double passage pour l'inspection et l'échantillonnage du lait de vache.

La Wilaya de M'Sila, dans ses limites actuelles, occupe une position privilégiée dans la partie centrale de l'Algérie du Nord ; sa superficie est estimée à 1817500 ha (DSA M'sila, 2014). En effet, sa SAU ne représente qu'une faible partie 277,211 ha (15,3 %) de la superficie totale qui est destinée à l'agriculture et notamment l'arboriculture fruitière (abricotier, l'olivier...), la céréaliculture (blé dur et tendre et orge) et les cultures maraîchères.

La Wilaya de M'sila appartient à l'étage bioclimatique semi-aride, d'une pluviométrie faible et irrégulière ne dépassant guère les 250 mm/an, c'est ce qui explique la faible couverture végétale des parcours steppiques qui représentent presque 57 % des terres de la commune soit 1029945 ha (DSA M'sila, 2014). En ce qui concerne le cheptel bovin dans la commune de M'sila, l'élevage total bovin représente 29000 têtes, et pour les vaches laitières 18600 têtes (DSA M'sila, 2015).

La commune de Boussaâda, est une commune de la wilaya de M'Sila, située à 69 km au sud-ouest de M'Sila et à 241 km au sud-est d'Alger ; sa superficie est estimée à 249,34 km².

Le climat est caractérisé par une chaleur estivale, rigueur hivernale, pluies rares mais régulières et neige sur les monts parfois. La commune Boussaâda est destinée à l'agriculture et notamment les cultures maraîchères, fourragère, l'élevage bovin, l'élevage ovin (EL-HAMEL et OULTEM) et l'arboriculture (DSA Boussaâda, 2015). L'élevage total bovin est représenté 1431 têtes, et pour les vaches laitières 1058 têtes (DSA Boussaâda, 2015).

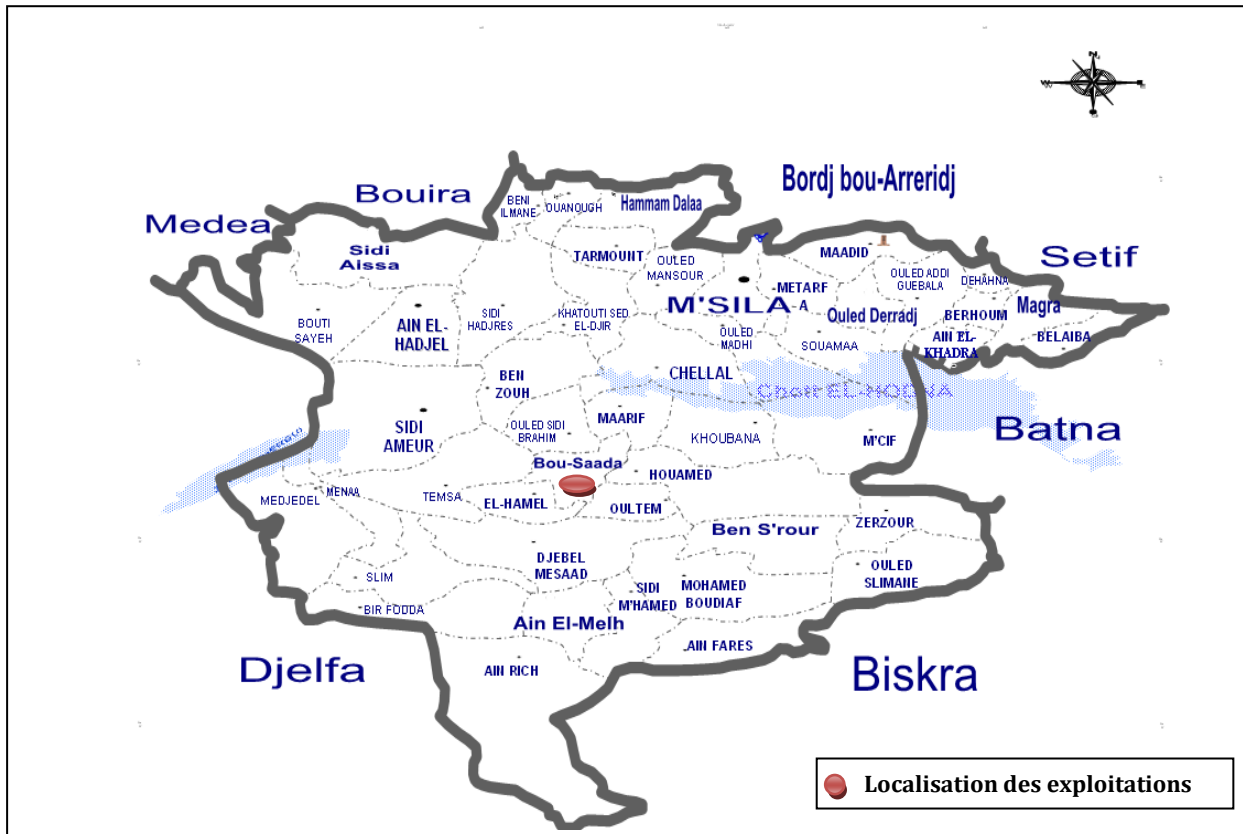


Figure N° 2: situation géographique de la wilaya de M'sila et la commune de Boussaâda

IV.2.2 Inspection des lieux d'échantillonnage

Avant l'échantillonnage une fiche technique (annexe1), visant à recueillir des informations relatives à la conduite d'élevage et aux performances techniques, a été établie et rempli sur place dans les fermes inspectées. La fiche englobe des variables relatifs à la pratique d'élevage des bovins laitiers (bâtiments d'élevage, effectif des bovins, mode de traite, conduite alimentaire et hygiène).

IV.2.3 Echantillonnage

Les échantillons du lait de vache destinés au laboratoire ont été collectés juste après la traite matinale à partir du lait de mélange. L'échantillonnage a été effectué dans des flacons stériles et hermétiquement fermés qui sont acheminés au laboratoire dans une glacière pour éviter le virage du lait (acidification). Deux échantillons ont été prélevés pour les analyses un pour les analyses physico chimique et l'autre pour les analyses microbiologiques.

Les échantillons de lait sont acheminés directement au laboratoire. Le temps maximal entre le prélèvement et l'analyse de l'échantillon ne dépassait pas trois heures.

IV.3 Qualités physico-chimiques et microbiologiques du lait

Les différentes analyses réalisées dans cette étude, ont été menées au niveau des laboratoires de contrôle de qualité physico-chimique et microbiologique de la laiterie HALIB BILADI à Boussaâda (M'sila). Une partie des analyses physico-chimiques du lait (MS, protéine et lactose) et les analyses de l'aptitude de transformation du lait (tests de coagulation et d'égouttage) ont été réalisées au niveau de laboratoire d'agronomie (Université de M'sila).

IV.3.1 Présentation du lieu de stage

La laiterie de «HALIB BILADI», située dans la zone industriel de la ville de Boussaâda, appartient au groupe industriel pour la production du lait et dérivés. Cette unité a commencé sa production en 2009 et s'étend sur une superficie de 3000 m².

Elle produit une gamme diversifiée de produits laitiers (capacité de production) :

- Lait reconstitué pasteurisé : 5000 L /24h
- Lait de vache pasteurisé : 24000 L/J
- Lben : 5000 L /J
- Raib : 5000 L /J
- Beurre : 2400 Kg /J
- Yaourt : 7000 Pots /8h = 56000 P /J
- Crème fraîche : 240 Kg/J
- Fromage fondu en barquette : 5000 Kg/J
- Jus pasteurisé 1 L : 5000 L/J

La laiterie de «HALIB BILADI» est constitué de :

- Ateliers de transformation équipés d'installation automatique de nettoyage et de désinfection,
- Chambre froide pour le stockage,
- Locaux de stockage de matières premières,
- Bâtiment administratif,
- Laboratoire pour les analyses physico-chimiques et microbiologiques.

IV.3.2 Réactifs et appareillages

Les différents appareillages utilisés dans notre étude sont résumés dans le tableau ci après :

Tableau N°9 : Appareillages utilisés dans les analyses du lait.

Laboratoire «HALIB BILADI» (Boussaâda)	Laboratoire d'agronomie (M'sila)
<ul style="list-style-type: none"> • pH mètre (Hanna-instruments) ; • Butyromètre de GERBER ; • Bain Marie (Mettler) ; • Etuves Mettler (Allemagne) ; • Incubateur Mettler (Allemagne) ; • Bec bunsen ; • Centrifugeuse; • Lacto-thermo-densimètre. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bain Marie (Mettler) ; • Dessiccateur ; • Balance de précision (Kern) ; • Spectrophotomètre (Shimadzu) ; • Vortex (Fischer scientifique) ; • Etuve Nüve (Turke); • Agitateur (Sturart).

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité analytique. Les réactifs de VWR (PROLABO) proviennent d'AMERIQUE ; les milieux de cultures (PCA, VRBL, OGA, BP, VF) proviennent de l'institut pasteur, ALGERIE ; et les autres réactifs et solvants utilisés de BIOCHEM CHERMOPHARMA et SIGMA-ALDRICH proviennent de CANADA et ALLEMAGNE.

IV.4 Analyses physico-chimiques du lait

IV.4.1 Détermination de l'acidité titrable (AFNORNF VO4 – 207)

✓ Principe

Titration de l'acidité par une solution alcaline en présence de phénolphthaléine.

✓ Mode opératoire

L'analyse se fait sur le lait de vache cru en suivant ces étapes :

- Introduire dans un bécher 10 ml de lait ;
- On y ajoute 2 gouttes de phénolphthaléine ;
- On fait le titrage avec la soude (NaOH 0,1 N) jusqu'au début du virage de la couleur en rose.

✓ **Lecture**

Les résultats de trois répétitions sont pris une fois la couleur a changé. L'acidité du lait est exprimée en °Dornic.

$$\text{Acidité} = (v_1/v_0) \times 100$$

Où :

v_0 : le volume en ml de lait.

v_1 : le volume en ml de la solution NaOH 0,1 N.

IV.4.2 Mesure du pH✓ **Principe**

Le pH représente l'acidité du produit à un moment donné. On le mesure habituellement à l'aide d'un pH-mètre. Le pH-mètre est un appareil électronique muni d'une électrode qu'on plonge dans le lait. L'électrode qui renferme une solution aqueuse acide, comporte une membrane de verre spécial perméable aux ions H^+ . La différence entre les ions H^+ de la solution contenue dans l'électrode et les ions H^+ du lait est convertie en une différence de potentiel électrique. Le pH-mètre transforme cette différence de potentiel en unité pH.

✓ **Mode opératoire**

La détermination du pH se fait directement en plongeant l'électrode dans un bécher contenant la solution à analyser.

✓ **Lecture**

La lecture de la valeur du pH est effectuée en attendant jusqu'à la stabilité de l'affichage sur l'écran du pH mètre.

IV.4.3 Détermination de la densité du lait✓ **Principe**

C'est le rapport entre la masse volumique du lait et celle d'un même volume d'eau, elle dépend de la teneur en matière sèche et en matière grasse.

✓ **Mode opératoire**

On met une quantité de 250 ml de lait dans une éprouvette puis on plonge le lacto-thermo-densitomètre dans le lait et on le laisse jusqu'à ce qu'il se stabilise.

✓ **Lecture**

Faire la lecture sur le lacto-thermo-densitomètre

$$D = d_0 + 0,2 (T - 20) \text{ } ^\circ\text{C}$$

D : densité corrigée

d_0 : densité lue

T : température du lait

IV.4.4 Détermination de la teneur en matière grasse (Méthode acido–butyrométrique de Gerber) (NF EN ISO 1211/ 2001)

✓ Principe

La séparation de la MG du lait par la centrifugation dans un butyromètre qui attaque les éléments du lait excepté la MG par l'acide sulfurique, la séparation de la MG est favorisée par addition d'alcool iso-amylque.

✓ Mode opératoire

- Introduire dans le butyromètre 10 ml d' H_2SO_4 (acide sulfurique $d = 0,818$) ;
- Ajouter à l'aide d'une pipette 11 ml de lait, en plaçant la pointe de la pipette en contact avec le butyromètre pour éviter le mélange prématuré du lait avec l'acide sulfurique ;
- Puis, on ajoute 1 ml d'alcool iso-amylque, en prenant soin de ne pas mélanger les liquides ;
- On bouche le butyromètre et on passe à l'agitation jusqu'à ce que le mélange devient homogène ;
- A ce stade le butyromètre se trouve porté à une température qui avoisine $80\text{ }^\circ\text{C}$ du fait du mélange de l'acide avec le lait ;
- Après l'agitation, on procède à la centrifugation à une température de $65\text{ }^\circ\text{C}$, 1200 tours /min, durant 5 min ;

✓ Lecture

Enlever le butyromètre du Centrifugeuse et ajuster soigneusement le bouchon du col pour amener l'extrémité inférieure de la colonne grasse, en déplaçant au minimum la colonne, devant un trait-repère chiffré. La lecture doit être faite rapidement en déplaçant le butyromètre devant l'œil et lire le niveau le moins bas du ménisque. La teneur normale du lait en MG est 40 g /l.

IV.4.5 Détermination de la teneur en matière sèche (NA 1213 / 1992)

✓ Principe

Le principe est basé sur la dessiccation de la prise d'essai à une température de $103\text{ }^\circ\text{C}$ dans une étuve isothermique ventilée, à la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'un poids pratiquement constant.

✓ Mode opératoire

- Préparer les creusets, en les mettant dans l'étuve ($103 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$) une demi-heure, en les refroidissant et en les pesant ;
- Peser 1 ml de l'échantillon dans les creusets ;
- Sécher les échantillons dans l'étuve à $103 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ durant 24 h, refroidir au dessiccateur pendant 30 min.

✓ **Lecture**

La teneur en matière sèche est donnée par la relation suivante :

$$MS\% = (m_1 - m_0) \times 100 / m_2$$

Où :

MS : matière sèche en %

m_0 : masse de creusets vide (g).

m_1 : masse de creusets et résidu du lait (g).

m_2 : poids prélevé (g).

IV.4.6 Détermination de la teneur en Lactose (AFNOR, 1993)✓ **Principe**

Le lactose, principal glucide du lait, a surtout un rôle énergétique et représente environ 30 % de la valeur calorique du lait. Et déterminé par le spectrophotomètre visible.

✓ **Mode opératoire**

- A 1 ml de lait dilué dans l'eau distillée on ajoute 1 ml de phénol (5 % p/v) et 5 ml d'acide sulfurique ;
- L'ensemble est homogénéisé mécaniquement sur vortex ;
- Porté 5 min à ébullition ;
- L'absorbance est lue à 490 nm contre un témoin préparé avec l'eau distillée.

✓ **Lecture**

Pour mesurer les valeurs d'absorbance faire la lecture sur le spectrophotomètre visible.

IV.4.7 Détermination de la teneur en protéine (Lowry et al., 1951)✓ **Principe**

Le dosage des protéines totales est déterminé par la méthode de LOWRY et al (1951). C'est une mesure colorimétrique où l'addition d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu à une solution protéique donne une coloration bleue foncée. Cette coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine.

✓ **Mode opératoire**

- A 0,5 ml d'échantillon à doser, convenablement dilué dans l'eau distillée, on ajoute 2,5 ml de la solution A (1 ml de tartrate double Na et K à 2 %, 1 ml de CuSO_4 à 1 % et 100 ml de Na_2CO_3 à 2 % dans NaOH 0,1M).
- Après dix minutes, on ajoute rapidement 0,25 ml de la solution B (Réactif de Folin-Ciocalteu) ;

- Mélanger le contenu du tube ;
- Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorption est lue à 750 nm contre un blanc constitué l'eau distillée.
- Une courbe d'étalonnage du BSA a été préparée.

✓ **Lecture**

Pour mesurer les valeurs d'absorbance faire la lecture sur le spectrophotomètre visible. Les teneurs en protéines ont été exprimées en % en se référant à la courbe d'étalonnage de BSA.

IV.4.8 Test d'amidon

✓ **Principe**

Ce test est basé sur la nature du lait (naturel ou reconstitué). Il consiste à l'ajout l'eau iodée dans quelques ml de lait.

✓ **Mode opératoire**

- Introduire une quantité de lait dans une bécher ;
- Ajouter quelques gouttes de l'eau iodée ;

✓ **Lecture**

On observe apparition d'une couleur jaune donc le lait est normale (absence d'amidon). Si la couleur vire vers le bleu, le lait contient l'amidon.

IV.4.9 Test de bromocrysol

✓ **Principe**

Ce test rapide est effectué surplace pour déterminer si le lait est très acide ou non.

✓ **Mode opératoire**

- Introduire une quantité de lait dans une bécher ;
- Ajouter quelques gouttes de bromocrysol ;

✓ **Lecture**

On observe apparition d'une couleur bleu donc le lait est normale (n'est pas acide).

IV.4.10 Test d'antibiotiques

✓ **Principe**

Le test d'antibiotiques est réalisé par la méthode Eco Test easy MRL (Maximum Residual Limit = quantité résiduelle maximale autorisée) est basé sur la réaction spécifique aux antigènes/anticorps ; Le test rapide d'agent inhibiteur pour déceler les antibiotiques β -lactame et les tétracyclines dans le lait de vache.

✓ **Mode opératoire**

- Verser l'échantillon de lait dans un récipient ;

- Plonger le papier-test la flèche vers le bas dans le récipient de test jusqu'à ce qu'il touche le fond ;
- Attendre 5 à 8 minutes.

✓ **Lecture**

Toutes les lignes apparaissent: résultat de test négatif, pas de reconnaissance d'antibiotiques dans le lait.

IV.5 Analyses microbiologiques

Les différents échantillons du lait de vache cru ont subis un ensemble des analyses microbiologiques pour contrôler leur qualité hygiénique. Les analyses effectuées sont résumées dans le tableau N°10.

Tableau N°10 : Analyse microbiologique effectuée.

Germe recherché	Milieux utilisé	T° d'incubation	Durée d'incubation
Mésophile totaux	PCA	37 °C	24 h
Coliforme totaux	VRBL	37 °C	24 à 48 h
Coliforme fécaux	VRBL	44 °C	24 à 48 h
Levure et moisissure	OGA	25 °C	3 à 5 jours
<i>Staphylococcus aureus</i>	BP	37 °C	24 h
Clostridium SR	VF	37 °C	24 à 48 h

SR : sulfito-réducteurs

IV.5.1 Préparation des échantillons

Des dilutions décimales ont été préparées en utilisant des tubes à essai stériles contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Toutes les manipulations doivent être effectuées avec tous les précautions d'asepsie exigées en microbiologie. On prélève 1 ml de l'échantillon après agitation que l'on introduit dans le tube contenant 9 ml de diluant stérile. Cette opération est répétée plusieurs fois et ceci jusqu'à la préparation de la dernière dilution.

IV.5.2 Recherche et dénombrement de la flore mésophile totale

La recherche et dénombrement des mésophiles totaux ont été effectués par la technique en milieu solide :

A partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , porter aseptiquement 1 ml dans une boîtes de pétri vides préparées à cet usage et numérotées. Compléter ensuite la boîte avec environ 20 ml de gélose PCA (Plat Cante Agar). Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de «8» pour permettre à l'inoculum de bien se mélanger à la gélose utilisée. Les boîtes seront incubées à 37 °C pendant 24 h (FIL, 1991).

- ✓ **Lecture** : on observe la présence des colonies de couleur beige.

IV.5.3 Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux

La recherche et dénombrement des coliformes ont été effectués par la technique en milieu solide :

A partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , porter aseptiquement 2 fois 1 ml dans une boîtes de pétri vides préparées à cet usage et numérotées. Compléter ensuite la boîte avec environ 20 ml de gélose au VRBL (Violet Red Bile With Lactose Agar). Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de «8» pour permettre à l'inoculum de bien se mélanger à la gélose utilisée. Une série de boîtes seront incubées à 37 °C pendant 24 h à 48 h et servira à la recherche de coliformes totaux, l'autre série sera incubée à 44 °C pendant 24 h à 48 h et servira à la recherche de coliformes fécaux.

- ✓ **Lecture :** la présence des coliformes est révélée par la présence des colonies rouges d'au moins 0,5 mm de diamètre (AGGAD et al., 2009).

IV.5.4 Recherche et dénombrement des levures et moisissures

A partir des dilutions décimales, 10^{-1} à 10^{-2} , une quantité de 1 ml de solution a été portée aseptiquement dans une boîte de pétri contenant un milieu de culture OGA (Oxytétracycline Glucose). Les gouttes sont étalées à l'aide d'un râteau stérile, puis incubées à température ambiante 25 °C.

- ✓ **Lecture :** la lecture et le dénombrement sont réalisés 5 jours après l'incubation.

IV.5.5 Recherche et dénombrement *Staphylococcus aureus*

La recherche de *Staphylococcus aureus* se fait dans un milieu de BP (glucose de Baird-Parker) solide. Après l'avoir fondu, il est coulé dans des boîtes de pétri. On étale 0,1 ml de l'inoculum dilué sur toute la surface de la boîte. L'incubation se fait pendant 24 à 48 h à 37 °C.

- ✓ **Lecture :** les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent, noires, brillantes, convexes et entourées d'un halo clair d'environ 2 à 5 mm de diamètre (MANNER, 2001).

IV.5.6 Recherche et dénombrement de *Clostridium sulfito-réducteurs*

A partir de chaque échantillon du lait, 1 ml de lait prélevé aseptiquement est versé dans un tube stérile. La sélection de formes sporulées est réalisée par chauffage de 10 min à 80 °C pour détruire les formes végétatives (ROSE et al., 2004). 0,5 ml d'une solution à 5 % de sulfite de sodium et 2 à 3 gouttes de solution de citrates de fer à 5 % sont ajoutés avant de mettre en chauffage. Après agitation, les tubes sont refroidis à température ambiante et 7 ml de gélose VF (Gélose Viande-Foie Glucosée) est ajouté pour assurer l'anaérobiose. L'incubation est réalisée à 37 °C pendant 24 à 48 h (JOFFIN et al., 1999).

- ✓ **Lecture :** les colonies de *Clostridium sulfito-réducteurs* apparaissent, des grosses colonies noires, produisant des sulfures à partir des sulfites qui ont précipité avec les ions de fer, sont considérées clostridies sulfito-réducteurs (AGGAD et al., 2009).

IV.6 Aptitude technologique du lait

La transformation du lait en fromage comporte trois étapes principales: la coagulation, l'égouttage et l'affinage (VIGNOLA, 2002). La qualité de lait représente une notion complexe parce qu'elle possède plusieurs dimensions telles que la qualité physicochimique et microbiologique ainsi l'aptitude fromagère. La valeur d'un lait peut être jugée par son efficacité à la transformation en fromage. L'aptitude à la coagulation dépend de son pH, sa teneur colloïdale et en caséine, qui jouent un rôle primordial dans la mise en place du gel (MARTIN et COULON, 1995).

IV.6.1 Test de coagulation (méthode de Berridge)

La coagulation se traduit par la formation d'un gel (ou coagulum) qui résulte, des modifications physico-chimiques qui interviennent autour des micelles de caséines et qui concourent à leur déstabilisation extrême (MIETTON, 1995).

✓ Principe

Cette méthode consiste à déterminer visuellement, à l'aide d'un chronomètre, à partir du moment de l'addition de la solution enzymatique coagulante (1 ml de la solution enzymatique dans 10 ml du lait) le temps d'apparition des premiers flocons des micelles de caséine (taille de $2,10^{-4}$ m) qui corresponde au temps de prise. Le temps de coagulation est trois fois le temps de prise.

✓ Préparation de substrat de Berridge

Peser 12 g du lait écrémé en poudre 0 % de matière grasse (low heat milk provenant de la laiterie Halib Biladi) qu'il faut dissoudre dans 100 ml de solution de CaCl_2 à 0,01 mol et suivre une agitation lente pendant 20 minutes, le substrat est réparti dans des tubes à essai à raison de 10 ml pour chacun et maintenir 30 minutes dans un bain Marie à 35 °C (pH 6,5).

✓ Mode Opérateur

- A 10 ml de lait on ajoute 1 ml de présure avec 03 répétitions,
- Les tubes sont placés au bain marie à 40 °C,
- On enregistre le temps de coagulation lorsqu'on observe l'apparition des premiers flocons des micelles de caséine.
- Le substrat de Berridge est utilisé comme standard.

IV.6.2 Test d'égouttage

L'égouttage qui permet la séparation du lactosérum du caillé. Son but est non seulement de régler la teneur en eau du caillé mais aussi la minéralisation de ce dernier et son délactosage. Il est possible de distinguer dans cette phase deux actions complémentaires : (ABDOUNE, 2003).

- expulsion du sérum par le coagulum qui se contracte et se concentre (synérèse).
- séparation du sérum et du caillé par action physique.

✓ Mode Opérateur

- A 15 ml de lait on ajoute 1 ml de présure,
- Laisser les tubes à essai au bain marie à 40 °C jusqu'à une coagulation complète,
- Filtrer le coagulum sur un papier filtre durant 24 h,
- Après 24 h mesurer le volume de lactosérum égoutté.

IV.6.3 Test fermeté

C'est une estimation visuelle de la dureté du caillé.

✓ Mode Opérateur

- A 10 ml de lait on ajoute 1 ml de présure,
- Laisser les boites pétri à l'étuve à 40 °C jusqu'à coagulation complète,
- Observe à l'œil nu la fermeté du caillé : caillé ferme, friable, liquide.