REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MEDEA
FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**
En : Biologie
Spécialité : Microbiologie appliquée

Par :

OURAK Meriem
CHIBANA Samia
ZIAINIA Noussaiba

Thème :

Etude des propriétés physicochimiques et sensorielles d'un fromage fabriqué à base de présure de remplacement d'origine microbienne

Soutenue publiquement le : 19/06 /2018. Devant le jury composé de :

Mr BENHAFRI Nadir	MAA	Université de Médéa	Président
Mr CHAMIBouaza	MAA	Université de Médéa	Examinateur
Mr AINES Mahfoud	MCB	Université de Médéa	Examinateur
Mme BOUMDIENE Farida	MAB	Université de Médéa	Encadreur

Année universitaire 2017/2018

Remerciement

En premier lieu nous remercions allah le tout puissant pour la volonté et le courage qu'il nous a donné pour réaliser ce modeste travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promotrice Madame ***BOUMEDIEN Farida****, qu'elle nous soit permise de la remercier vivement, et lui exprimer notre profonde gratitude pour l'aide précieuse et les conseils qu'elle nous sans cesse prodigué afin de mener à terme ce travail.*

Nous aimerions également exprimer nos remerciements :

A monsieur ***BENHAFRIE*** *qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. A* ***MrCHAMI*** *et****Mme BOUKHALFOUN*** *pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant de juger notre modeste travaille.*

A Mr ACHEK Rachid *et* ***Mr BOUBEKRI Kamel,*** *Pour ses encouragements et ses conseils durant la réalisation de ce travail surtout au sien de laboratoire de la faculté ;*

Nous remercions également les responsables de laboratoire de la faculté département de Science Et Technologie dans notre université et spécialement Melle Imen pour avoir facilité le travail au laboratoire durant l'élaboration de l'expérimentation de travaille ; et pour son aide et sa gentillese.

A toute l'équipe administratif de notre département de science de la nature et de vie.

Nous tiens également à présenter nos plus vifs remerciements A :

Toute les responsables du ferme baba Ali « ETELVE » en particulier : Mme Salima ; Mr dawed.Laboratoire d'hygiène de Blida

Laboratoire de contrôle de qualité et de conformité de Blida. ; Laitier TOMLAIT

Nous adressons nos remerciements au : bouchaaba yousef Pour son aide.

A nos enseignants qui nous accompagnent tout au long de notre démarche. Enfin, un grand merci à tous qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Toutes personnes ayant participé de près ou de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apporté leurs soutiens et encouragements durant la réalisation de ce travail.

Merci à touts

Dédicace

A l'aide de notre dieu le tout puissant on a pu faire ce modeste travail que je dédie à :

A celle qui m'a comblé d'amour, de soutien et de tendresse. A vous mon signe de joie et de bonheur, ma fierté et mon honneur : Ma Mère yamina

A celui qui a sacrifié toute sa vie pour me guider et m'encourager avec ces précieux conseils et son soutien tout au long de mes études : Mon pèremohamed

A mes chers frères : yassine.yousef.sidahmed

A mes adorables soeurs : Laila

Ames chères grandes -mères

A mon cher amis .bellalbelateche pour son aide précieuse et sa persévérance tout au long de mon projet et toute sa famille.

ET bien sur à mes copines de mon chemin, mes soeursamia etnosaiba qui sont toujours à côté de moi dans les rires comme dans les larmes.

Tous mes oncles, tantes, cousins, cousines Pour leur soutien et encouragement, tout au long de mes études.

A mes meilleures amis : nadjlae.sondous.yasmine. nesrin.karima.soumia.samira Zahida.Molkhire A tous ce qui me connaisse.Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, soeurs et des amis sur qui je peux compter.En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

MERIEM

Dédicace

Avant tout, je remercie dieu le tout puissant de m'avoir donné la chance d'étudier et de suivre le chemin de science et de la connaissance, aussi la volonté et la patience pour faire ce modeste travail.

Avec tout l'amour qui se trouve dans mon cœurje dédie ce modeste travail :

A mes parents qui m'ont aidé d'achever mon chemin d'affranchir la vie, ceux qui ont toujours été là pour moi, la femme la plus patiente **ma très chère mère,** source d'affectation de courage et d'inspiration qui a autant sacrifié pour mon bonheur, ma réussite et pour me voir atteindre ce jour.et**Mon cher père**, source de respect, en témoignage de ma profonde reconnaissance pour tout l'effort et le soutien incessant qui m'a toujours apporté. Aucune dédicace ne saurait exprimer ma grande admiration, ma considération et ma sincère affectation pour vous deux.

A mon grand frère**Miloud** qui est très chère a mon cœur qui a sacrifié toute sa vie pour me guider et m'encourager avec ces précieux conseils et son soutien tout au long de mes études et aussi mes très chers frères **Azouz** et **Ayoub**, je vous réserve toujours une grande place dans mon cœur et mes pensées.

A ma sœur **Abla** qui m'a donné tout son amour pour reprendre mes études.

A mon grand-père**Attallah**.

A toutes ma famille.

A toutes mes oncles, tantes, cousines et cousins.

A mon amie le plus proche **Saïd** qui est très chère a mon cœur pour son aide, son soutien et qui m'a soutenu tout au long duré de mon travail et bien Sur a toute sa famille.

A ma promotrice **M^{me} BOUMEDIENE Farida** pour ses conseils scientifiques et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail.

A mes copines de mon chemin **Noussaiba** et **Meriem** qui son toujours à coté de moi.

A tous les enseignent surtout Monsieur **BENADJI**.

A tous la promotion de MicrobiologieAppliquée.

A mes meilleures Amies : Amina, Ahlem, Noura, Khadidja, Sabrina, Marwa, Malika, Meriem.

A toutes qui connait Samia.

SAMIA

Dédicace

Avant toute dédicace je tiens à remercier « Allah » le tout puissant qui m'a donné le courage pour mener Ce travail à terme.

Je dédie Ce modeste travail

Ceux qui ont donné un sens à mon existence, en m'offrant une Éducation digne de confianceCe qui a attendu avec patience Les fruits d'une bonne éducationA celle qui madonné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur etma réussite à ma mère…

A mes chères adorables sœurs : Sarah et Hadjer

A mes frères : Bilal, Mohamed ET SA femme Ihsan

Une dédicace speciale à mon frère Ahmad, pour son aide et sa gentillése.

A mes très chères petits : Kholoud ;Solaf ; Nourelyakine ; Adam et Abdelbaset.

A mes tantes et mes oncles

A toute ma famille

À mon chère amis " Abou bakerboukhari" qui est chère à mon coeur pour ses encouragements, son soutient, son aide et sa disponibilité. Je sais que je peux compter sur toi "merci Aboubaker "

Et bien sûr à mes copines de mon chemin, mes sœur samia et meriem qui sont toujours à côté de moi dans les rires comme dans les larmes.

A mes amies : Sabrina, Marwa ; Ahlam ; Khadidja ; Sarah ; DJANDI Sabrina

A Tous les enseignants qui m'ont suivi tout au long de Mon parcours éducatif

A toute la promotion de microbiologie appliqué (2013 /2014). A tous qui m'aide prés ou loin ; merci à vous.

NOUSAIBA

Rèsumè

Résumé

Différentes recherches et études ont étés réalisés afin de trouver des succédanés de présure commerciale coagulant le lait, et dans ce cadre notre travail pour le but de contribuer à une meilleure connaissance des protéases coagulantes, issues de la culture d'une souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens.*

L'extrait enzymatique brut obtenu à partir de la souche est caractérisé par une activité coagulante de 0.416 Up, avec une activité protéolytique de 0.522 DO 660, un indice AC/AP de 0.796 et une force de 1/100. Celle-ci est optimale à une température de 80°C, une concentration en CaCl2 de 0,08M et un pH de 5,5.

Les analyses microbiologiques de différents échantillons montrent que le fromage à une qualité hygiénique bonne marqué par une absence totale des germes indicateurs décontamination et de germes pathogènes à savoir : les coliformes totaux et fécaux, les *Salmonelles* et *Staphylococcus aureus* ainsi que les spores des anaérobies sulfito-réducteurs.

Les résultats du rendement fromager montrent que le fromage fabriqué à base d'EEB est plus meilleur que le fromage à base de présure industrielle.

Un essai de fabrication d'un fromage à pâte pressé cuite à permet de mettre en évidence l'aptitude fromagère de notre extrait on compare avec un fromage à base de présure Les résultats obtenus montrent que l'extrait coagulant obtenu des *Bacillus amyloliquefaciens* peut constituer une alternative à la présure commerciale pour la fabrication de fromage.

Mots clés : protéase microbienne, présure, coagulation, Fromage, *Bacillus amyloliquefaciens.*

Abstract

Various research and studies have been conducted to find commercial rennet substitutes coagulating milk. In this context Our work aims to contribute to a better knowledge of coagulating protéases, derived from the culture of a bacterial strain *Bacillus amyloliquefaciens*.

The crude enzyme extract obtained from the strain is caractérise by a coagulations activity of 0.416 Up, with a proteolytic activity of 0.522 (OD660), an AC / AP index of 0.796 and a force of 1/100.This is optimal at. a température of 80 ° C, à $CaCl_2$ concentration of 0.08M and a pH of 5.5.

A trial of manufacturing a cooked pressed cheese to highlight the cheese aptitude of our extract compared to commercial rennet.

In fact, the results obtained show that the coagulant extract of *Bacillus amylolequifaciens* can constitute an alternative to commercial rennet for the manufacture of cheese.

Microbiological analyzes of different simples show that the cheese has à good hygienic quality marked by à complète absence of indicator germs décontamination and pathogenic germs.

Cheese yield results show that cheese made from EEB is better than industrial rennet cheese, The analysis of the products obtained shows that There is no difference in quality between the cheese obtained with commercial rennet and that obtained with microbial coagulase.

Key Words : *Bacillus amyloliquefaciens*, microbial protéase, rennet, coagulation, cheese.

ملخص

لقد أجريت العديد من الأبحاث و الدراسات للعثور على بدائل النفحات التجارية, في هدا السياق يهدف عملنا إلى المساهمة في معرفة أفضل ب البروتياز المخثر للحليب المشتق من زراعة *bacillus amylolyquefaciens* يتميز مستخلص الإنزيم الخام الذي تم الحصول عليه من السلالة بنشاط تخثر يبلغ 0.416 UP ، مع نشاط تخثر للبروتين يبلغ 0.52(DO 660) ، ومؤشر AC / AP قدره 0.796 وقوة تخثر 1/100.هذه القوة تكون مثالية عند درجة حرارة 80 درجة مئوية، وتركيز CaCl2 من 0.08 مول ودرجة حموضة عند 5.5

تجربة لتصنيع الجبن المطبوخ المضغوط لإبراز قدرة الجبن لمستخلصنا مقارنة بالمنفحة التجارية

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن مستخلص الأنزيم الخام ل *bacillus amylolyquefaciens* يمكن أن يشكل بديلا للمنفحة التجارية لصناعة الجبن.

أظهرت التحاليل الميكروبيولوجية للعينات المختلفة أن الجبن يتمتع بنوعية صحية جيدة تميزت بغياب تام للجراثيم الممرضة و المسؤولة عن التلوث.

تظهر نتائج إنتاج الجبن أن الجبن المصنوع من EEB أفضل من جبن المنفحة الصناعية.

ويبين تحليل المنتجات التي تم الحصول عليها أنه لا يوجد اختلاف في الجودة بين الجبن الذي تم الحصول عليه بالمنفحة التجارية والتي تم الحصول عليها بخلاصة الأنزيم.

الكلمات لمفتاحية: Bacillus amyloliquefaciens، البرو تياز الميكروبي، المنفحة ، التخثر، الجبن.

Liste des Figures

Figure 01 : Observation de *Bacillus amyloliquefaciens* sous microscope électronique……..13

Figure 02 : Modèle de micelle de caséine avec sous-unités **(Amiot *et al.*, 2002)**……21

Figure 03 : Modification de la structure micellaire au cours de l'acidification (**Jeantet,**
2007)……25

Figure 04 : Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation présure (**Jeantet, 2007)**……25

Figure 05 : la révivification de souche *Bacillus amyloliquefaciens*…… *30*

Figure 06 : Préparation de milieu de culture……..32

Figure 07 : Récupération de surnagent…… 32

Figure 08 : Protocole d'obtention de l'extrait enzymatique brut produit par la souche *Bacillus amyloliquefaciens*…… *33*

Figure 09 : la pasteurisation de lait …… 40

Figure 10 : D'écaillage et délactosage……. 41

Figure 11 : lavage du caillé ……. 41

Figure 12 : Egouttage …… 42

Figure 13 : le moulage ……. 42

Figure 14 : le salage ……. 43

Figure 15: Résumé des étapes de fabrication du fromage à pâte cuite pressé……44

Figure 16: Schéma représente la préparation des dilutions…….. 48

Figure 17 : Caractère apparent de l'extrait enzymatique…….. 50

Figure 18 : Courbe étalon de sérum d'albumine bovin (BSA)…… 52

Figure 19 : comparaison de l'activité protéolytique de EEB de *B. amyloliquefaciens*.…….. .52

Figure 20 : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'EEB…..55

Figure 21 :effet du pH sur l'activité coagulante de l'EEB……. 56

Figure 22: Effet de la concentration en $CaCl_2$ du lait sur l'activité coagulante…….57

Figure 23 :Effet de la concentration en extrait enzymatique brut…….. 58

Figure 24 : Stabilité thermique de l'extrait enzymatique brut après 30min d'incubation**……..** 59

Figure 25 : Stabilité de l'extrait enzymatique brut au cours de la conservation….. 60

Figure 26 : EKOMILK pour les analyses physico chimiques de lait…… 61

Figure 27 : Variation des teneurs en EST et ESD des deux types de fromage….. 65

Figure 28 : Variation de la MG et MG/EST des deux types de fromages…… 65

Figure29 : Rendement fromager des deux échantillons de fromage…… 66

Figure 30 : Fromage fait à base d'EEB……. 66

Figure 31 : Fromage fait à base de la présure…… 67

Figure 32 : échantillons de fromages pour la dégustation (A : fromage à base d'EEB ; B : fromage à base de présure)…….. 69

Figure 33 : Histogramme des résultats des analyses de la couleur des fromages fabriqués. La différence observée est non significative dans l'intervalle **11-16** (zone entre les traits pleins)…… 70

Figure 34 : Histogramme des résultats des analyses de la texture des fromages fabriqués…… 70

Figure35 : Histogramme des résultats des analyses de l'homogénéité des fromages fabriqués. La différence observée est non significative dans l'intervalle **11-16** (zone entre les traits pleins)…… 71

Figure 36 : Histogramme des résultats des analyses de l'odeur des fromages fabriqués. La différence observée est non significative dans l'intervalle **11-16** (zone entre les traits pleins)…… 72

Figure37 : Histogramme des résultats des analyses de la salinité des fromages fabriqués…….. 72

Figure 38 : Histogramme des résultats des analyses de la dureté des fromages fabriqués. La différence observée est non significative dans l'intervalle **11-16** (zone entre les traits pleins)…….73

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition moyenne du fromage **(Abdoune, 2003)……** 23

Tableau 02 : Classification des fromages…….. 25

Tableau 03 : Absorbance des différents Mc Farland Standard à 600 nm…… 31

Tableau 04 : Activité coagulante de l'extrait enzymatique brut…… 50

Tableau 05 : Comparaison de l'AC de l'EEB aux autre AC des coagulases….. 51

Tableau 06 : comparaison d'activité protéolytique par d'autre souche microbienne EEB de pepsine de bovin**……** 53

Tableau 07 : Composition physico-chimique du lait utilisé dans la fabrication du fromage…….. 61

Tableau 08 : Résultats physicochimique des fromages obtenus…… 63

Tableau 09 : Résultats des analyses microbiologiques des deux fromages selon les normes algériennes des fromages frais (**J.O.R.A)**…….. 68

Tableau 10: Tableau récapitulatif des résultats de test de dégustations obtenus sur les Fromages élaborés…….. 69

Liste des abréviations

AC : Activité coagulante.

AP : Activité protéolytique.

ANP : Azote non protéique.

AP : Azote protéique.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

Aw : activité water.

CMP : caséino macro peptide.

DO : densité optique**.**

D° : Degré Dornic.

ESD : extrait sec dégraissé.

EST : extrait sec totale.

EPT : Eau Peptonée Tamponné.

EEB :extrait enzymatique brute.

ECD2 : extrait coagulant gastrique de dromadaire âgé de 2 ans.

F_{EEB}: Fromage fait à base d'extrait enzymatique brute.

F_P : Fromage fait à base de la présure.

FIL :Fédération Internationale du Lait.

FAO : Food and alimentation organisation.

GNP : glycomacropeptide.

MG : matière grasse.

MS : Moyenne des scores.

pHi : point isoélectrique.

pH : potentiel d’hydrogène.

PBC : présure bovine commerciale.

PM : poids moléculaire.

Rdt : rendement fromagère.

SAB : sérum albumine bovine.

TCA : Acide trichloracétique.

UP : Unité présure.

US : Unité Soxhlet.

Sommaire

Partie I. Synthèse Bibliographique	Page
I .Présure et succédanés de présure	03
I .1.1 La présure	03
I 1.2.Dénomination	03
I 1.3 Préparation physico chimique de présure	04
I 1.4 Propriété physico chimique de la présure	05
➢ La chymosine	05
➢ La pepsine	05
I .1.5 Mode d'action de la présure	05
I .2.Les succédanés de présure	08
I .2.1 Enzymes coagulantes d'origine animale	08
a. La pepsine bovine	08
b. La pepsine porcine	09
I 2.2.Enzymes coagulants d'origine végétale	10
I 2.3.Enzymes coagulants d'origine microbienne	10
a. Enzymes coagulants d'origine fongique	11
b. Enzymes coagulants origine bactérienne	12
I 2.4.La chymosine produite par génie génétique	14
II. Le lait	16
II. 1.Définition	16
II.1.1. Définition alimentaire	16
II .1.2. Définition réglementaire	16
II.2.Caractéristiques du lait	16
II.2.1. Caractères organoleptiques	16
II.2.2. Caractéristiques physico-chimiques	17
II.3.La composition du lait	17
II.3.1 L'eau	17
II.3.2.Glucides	17
II .3.3. Lipides	18
II.3.4. Vitamines	18
II.3.5. Matières minérales	18
II.3.6. Matières azotées	19

II.3.6.1. Azote non protéique (ANP)	19
II.3.6.2. Azote protéique (AP)	19
II.3.6.2.1. Les protéines de sérum	19
II.3.6.2.2. Les caséines	19
II.3.6.2.2. 1.Caractères généraux des caséines	20
➢ Caséine αs	20
➢ Caséine β	20
➢ Caséine γ	20
II.3.6.2.2.2.Micelle de caséine	21
III. Fromage	22
III. 1. Définition	22
III.2.Composition moyenne du fromage	22
III.3.Conditions nécessaires à la fabrication fromagère	23
III.4. Etapes de fabrication du fromage	24
III.4.1 .Préparation du lait	24
III.4.2 .Coagulation	24
III.4.2.1.Coagulation acide	24
III.4.2.2.Coagulation enzymatique	25
III.4.2.3.Coagulation mixte	25
III.4.2.3.1. Mécanisme d'action de la coagulation	26
III.4.3 .l'égouttage	27
III.4.4. Salage	27
III.4.5. Affinage	28
III.5.Classification des fromages et appellations	28
Partie II .MATERIELS ET METHODES	
I. Origine de la souche	30
I.1 .Obtention de l'extrait coagulant de *Bacillus amyloliquefaciens*	30
I . 1.1.Revivification de la souche *Bacillus amyloliquefaciens*	30
I1.2..Préparation de l'inoculum	30
I.1.3. Préparation et inoculation de milieu de culture	31
I. 1.4. Extraction de la protéase extracellulaire	32
II.Caractérisation de l'extrait enzymatique brut	34

II.1. Mesure des activités enzymatiques	34
II.1.1. Mesure de l'activité coagulante (AC)	34
a- la méthode de Berridge	34
b- méthode de Soxhlet	34
II.1.2. Mesure de l'activité protéolytique	35
II.2.Détermination de l'indice AC/AP	35
II.3. Dosage des protéines	35
II.4. Détermination des conditions optimales de l'activité coagulante	36
II.4.1.Détermination de la température optimale d'activité	36
II.4.2.Influence du pH de lait	36
II.4.3.Détermination de la concentration optimale de $CaCl_2$	36
II.4.4.Influence de la concentration en extrait enzymatique	37
II.4.5. Etude de la stabilité thermique de l'extrait enzymatique	37
III.Analyse physico-chimiques de lait	37
III.1.Dosage de l'acidité Dornic	37
III.2.Détermination de l'extrait sec total	38
III.3.Détermination de l'extrait sec dégraissé (ESD)	38
IV.Essai de fabrication du fromage à pâte pressée cuite par l'utilisation de l'EEB	39
IV.1. Étapes de fabrication du fromage	39
IV. 2. Analyses physico-chimique du fromage	45
IV.3.analyse microbiologique de fromage	47
IV.4.Analyse sensorielle du fromage	48
PartieIII : RESULTATS ET DISCUSIONS	
I. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut (EEB)	50
I.1. Caractère apparent de l'extrait enzymatique	50
I.2. Activité coagulante de l'EEB	50
1.3. Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique	52
I.4. Activité protéolytique	52
I.5. Détermination de l'indice AC/AP	54
I.6**. Les conditions optimales de l'activité coagulante**	54
I.6.1.Influence de la température sur l'activité coagulante	54

I.6.2. Influence du pH sur l'activité coagulante	56
I.6.3. Influence de la concentration en $CaCl_2$	56
I.6.4. Influence de la concentration en extrait enzymatique brut	58
I.6.5.Etude de la stabilité de l'EEB	58
I.6.5.1. Stabilité thermique de l'EEB	59
I.6.5.2. Stabilité au cours de la conservation à 4°C et -18°C	59
II. Analyses physicochimiques du lait	60
III. Essai de fabrication d'un fromage à pâte pressée cuite	63
III. 1.Analyses physicochimiques du fromage	63
III. 1.1. Rendement fromager	66
III. 2.Analyse microbiologique de fromage	67
III. 3. Analyses sensorielles	68
Conclusion	74
Références bibliographiques	
Annexes	

INTRODUCTION

Introduction

La coagulation du lait est l'étape déterminante dans la production fromagère, assurée par des enzymes protéolytiques possédant des propriétés coagulantes, dont la présure animale qui renferme essentiellement de la chymosine est le principal agent coagulant appliqué à l'échelle industrielle. Elle joue également un rôle crucial dans le développement équilibré de l'odeur et la texture du fromage produit **(Kumar *et al.*,2005 ; El-Bendary *et al.*,2007 ; Sathya *et al.*,2009).**

En effet, l'extraction de la présure à partir des caillettes des veaux en sevrage, demanderait des sacrifices trop onéreux. En plus, la demande accrue de la production mondiale du fromage combinée à l'insuffisance des quantités de caillettes disponibles et leurs prix élevé ont provoqué une pénurie remarquable de cette enzyme protéolytique. Afin de remédier à cette situation, plusieurs recherches ont été activement poussées ces dernières années, visant à la mise en évidence des enzymes de remplacement dites succédanés de la présure de différentes origines (animale, végétale et microbienne), capables de coaguler le lait et d'assurer des meilleurs rendements fromagers **(Raposo et Domingos, 2008; Shieh *et al.*, 2009; Vishwanatha *et al.*, 2010; Mohamed Ahmed *et al.*, 2010).**

L'industrie est à présent capable de produire, en quantité pratiquement illimitée, ces succédanés à des prix concurrentiels, où la fabrication des différents types de fromage est déjà réalisée **(Bruno *et al,* 2010).**

Ainsi, un succédané de présure doit posséder une forte activité coagulante et une activité de protéolyse non spécifique modérée. Son choix est donc délicat car il doit présenter un certains nombres de propriétés physicochimiques et technologiques compatibles avec l'environnement fromager et une qualité alimentaire de produits finis **(Alais, 1984 ; Ramet, 1987).**

La production industrielle d'enzymes s'est essentiellement orientée vers le processus fermentaire, les enzymes microbiennes présentent de nombreux avantages par rapport à celle d'origine animale et végétale. Ils sont largement utilisées dans les procédés industriels en raison de leur faible coût, grande productivité, protection de l'environnement, la plasticité et la grande disponibilité **(Burhan *et al* ., 2003)**

Les espèces de *Bacillus* telles que *Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens et Bacillus licheniformis* sont très utilisés dans les cultures microbiennes industrielles pour la production d'une variété d'enzymes, ainsi que des substances biochimiques fines pendant des décennies. Les microorganismes du genre *Bacillus* ont connu un développement considérable pour la production d'enzymes industrielles en raison de leur bonne production de protéines enzymatiques **(Pinches *et al.*,1985)** et de leur facilité de culture, leurs enzymes sont des hydrolases qui présentent une large application pour le traitement de l'amidon en particulier *B. amyloliquefaciens.* Les microorganismes élaborent une large gamme des protéases, qui peuvent être intra et/ou extracellulaires, l'utilisation des champignons pour la production des enzymes, y compris les protéases, est devenue très développée vue les avantages qu'ils présentent depuis qu'ils sont devenus GRAS :

-La production des enzymes extracellulaires, ce qui facilite la récupération à partir du milieu de fermentation.

-La possibilité d'obtenir des rendements importants en enzymes **(Laxaman *et al.*,2005 ; Hajji *et al.*, 2008 ; Barnali *et al.*, 2008).**

Dans cette optique, notre objectif porte essentiellement sur l'étude des trois points principaux :

- la production d'une protéase par fermentation sur milieu semi solide en utilisant un résidu agroalimentaire peu coûteux (son de blé).
- L'obtention de la coagulase par culture de la souche *Bacillus amyloliquefaciens.*
- Caractérisation de l'extrait enzymatique brut (EEB) et L'étude de la qualité de fromages pressés à pâte cuite.

SYNTHÈSES BIBLIOGRAPHIQUE

I .Présure et succédanés de présure

La coagulation du lait par des enzymes protéolytiques est une des plus anciennes opérations de transformation alimentaire. Traditionnellement, l'enzyme protéolytique utilisée est la présure extraite des caillettes de jeunes veaux non sevrés. L'utilisation de succédanés d'origine animale, végétale et microbienne s'est développée au courant des trente dernières années et cela pour des raisons économiques, religieuses ou culturelles **(Dalgleish, 1997**).

Selon **la FAO**, afin d'introduire toute nouvelle enzyme, celle-ci doit respecter les modalités habituelles du déroulement des différentes phases de la fabrication en particulier :

- L'activité coagulante doit être bonne dans les conditions physico-chimiques des Laits habituellement transformés en fromagerie ;
- Les propriétés rhéologiques des coagulums doivent évoluer après la floculation de façon à permettre le travail mécanique du gel dans les délais habituels ;
- La synérèse du coagulum au cours de la phase d'égouttage doit permettre d'obtenir un fromage d'extrait sec et de composition chimique caractéristiques, dans un délai au plus égal à celui observé avec la présure ;
- Les modalités de l'affinage doivent permettre d'obtenir un produit fini présentant les normes organoleptiques habituelles après une durée de maturation voisine de celle des fromages fabriqués avec la présure ;
- Les rendements fromagers, exprimés en poids sec de fromage, doivent être au moins égaux à ceux relevés lors de l'emploi de la présure.

Différents types d'enzymes ont été utilisés depuis longtemps pour faire coaguler le lait, parmi ces enzymes on peut distinguer selon la source, les enzymes d'origine végétale, celles d'origine animale et celles d'origine microbienne.

I .1.1 La présure

La présure est un mélange de chymosine et de pepsine. C'est un extrait liquide ou pâteux provenant des caillettes des jeunes ruminants **(Mahaut *et al.*, 2000 ; D'Ambrosio et *al.*, 2003 ; Anema *et al*, 2005).**

Selon la législation française, l'extrait de présure doit contenir au minimum 520 mg de chymosine active par litre et le rapport chymosine/pepsine doit être supérieur ou égal à 1,38, ce qui signifie que 75 à 80% de l'activité coagulante est due à la chymosine. La chymosine est donc l'enzyme majeure de la coagulation du lait (**Dalgleish, 1992 ;Walstra et Jenness, 1992).** Elle appartient à la famille des endopeptidases, protéases agissant à l'intérieur des chaînes polypeptidiques**.** Elle possède une activité très spécifique. En effet, elle n'hydrolyse que la caséine κ pendant les fabrications fromagères (**Walstra et Jenness, 1992 ; Kumar *et al.*, 2006**). Cependant cette activité protéolytique se manifeste aussi sur toutes les protéines au cours de l'affinage du fromage.

I 1.2.Dénomination

La dénomination présure est réservée à l'extrait coagulant provenant de la caillette du jeune veau. Elle est sécrétée sous une forme inactive à l'état de pro-présure **(Abdellaoui, 2007).**

I 1.3Préparation physico chimique de présure

Généralement, l'extraction se fait par macération dans une solution saline pendant une durée donnée ou bien par homogénéisation ; ce qui est plus rapide **(Antonini et Ribadeau Dumas, 1971 ; Tageyama et Takahashi, 1976 ; Bohak, 1970 ; Haard*et al.*,**1982). L'extraction par digestion dans un milieu acide est également réalisée (**Ernstrom et Wongt, 1983 ; Cuveller, 1993).**

A l'échelle industrielle, la présure était extraite par macération de fragments decaillettes, préalablement gonflées et séchées au soleil, dans une saumure à 10% de sel commun, additionné d'antiseptique en faible quantité (acide borique, thymol, acide Benzoïque, etc.). La macération qui dure de plusieurs heures à quelques jours est réalisée à des températures allant de 25 à 38 °C, le pH est ajusté à 5,0-5,5 pour favoriser l'activation des pro enzymes (**Alais, 1974 ; Anifantakis et Green, 1980 ; Ramet, 1997**). Le jus brut est filtré puis clarifié par addition d'alun de potasse. L'extrait obtenu est généralement jaune d'or. Actuellement, la présure est extraite, principalement à partir de caillettes congelées, qui sont broyées et macérées dans une solution saline (3-10% de NaCl). L'activation des proenzymes est réalisée par maintien du pH à 2,0 pendant 1h. Après ajustement du pH de 2,0 à 5,5, l'extrait brut est filtré et concentré par précipitation à l'NaCl (**Andean, 2002**).

Ainsi, la présure est principalement caractérisée en technologie fromagère par sa force. Celle-ci est définie d'après **Soxhlet** comme étant le nombre de volume de lait frais de mélange, coagulé par un volume de présure en 40 minutes à 35°C. A titre d'exemple, un litre d'extrait de présure de force de 1/10000 est obtenu à partir de 1,5 à 2 caillettes de veau de 60g. Pour assurer la conservation de ce produit, l'addition de chlorure de sodium à raison de 16 à 18 % (m/v) est autorisée. Pratiquement, 1 kg de fromage affiné contient environ 0,0003 grammes de présure (**Veisseyre, 1979, Alais, 1984).**

La présure commerciale liquide a habituellement une force de 3.103 à 105. En poudre, elle est de 105 à 1,5 105 et à l'état cristallisé, elle atteint 107 **(Mahaut *et al.*, 2000).**

I 1.4Propriété physico chimique de la présure

- ✓ **La chymosine**

Elle est sécrétée par la caillette des jeunes ruminants non sevrés. La forme inactive de la chymosine est la prochymosine. Elle est transformée en enzyme active par un processus auto catalytique accéléré par les ions H+ **(Otani*et al.*, 1991).**

La chymosine (EC 3.4.23.4) appartient à la classe des protéases à acides aspartiques et est utilisée pour coaguler le lait dans la production des fromages. Son mécanisme d'action est basé sur la rupture de la liaison Phe105–Met106 de la caséineκ bovine (**Drohse et Fortran, 1989 ; Roseiro *et al.*,2003**). Elle cause la déstabilisation des micelles de caséines **(Daviau *et al.*,2000**). Il en résulte la coagulation du lait et la formation d'un coagulum notamment le fromage comme cité précédemment.

- ✓ **La pepsine**

Cette enzyme est sécrétée par la caillette des ruminants. Après le sevrage, la caillette secrète beaucoup de pepsine et très peu de chymosine. La pepsine (EC 3.4.23.1) est une protéase très acide. L'optimum pour l'activité protéolytique est voisin de 2,0. Elle est inhibée à des valeurs de pH supérieur à 6,6. Elle coupe de préférence entre 2 acides aminés hydrophobes et aromatiques (**Oner et Akar, 1993**).
Elle coagule le lait frais et ne doit pas être utilisé à des doses excessives car cela pourrait apporter des défauts de goût. L'emploi rationnel de la pepsine exige un

abaissement de pH du lait vers 6,3. L'activité catalytique de la pepsine et des endopeptidases à acides aspartiques dépend de la taille du peptide d'une part, et de la nature de résidus acides aminés relativement éloignés de la liaison peptidique d'autres part (**Blum *et al.*, 1985**).

La sécrétion de chymosine s'arrête au moment du sevrage lorsque des aliments solides sont présents dans la ration alimentaire, la production de pepsine s'accroît alors très fortement est devient dominante. L'obtention de présure à partir de veaux fistulés à fait l'objet de plusieurs expériences. La collecte de présure, deux fois par jour, jusqu'à ce que les veaux atteignaient trois à quatre mois, a permis l'obtention d'une quantité de présure 30 à 40 fois plus importante que celle obtenue par veau après abattage **(Alais , 1974 ; Ernestrom et Wongt, 1983).** Toutefois, le coût opératoire et les risques cliniques ont limité le développement de ce procédé.

I .1.5.Mode d'action de la présure

La présure (préparation enzymatique coagulante) dans le lait libère le caséinomacropeptide (CMP) et induit une diminution de l'hydratation des micelles de Caséine (passage de 2,5 g d'eau par gramme de caséine à 1,6 – 1,7 g/g à pH 6,60, et de la charge nette des micelles de caséine (cette charge passe de -15 -20 mV à -5 -8 mV)**(Miettone*t al.*,2004).**

-Paramètres influant la coagulation présure

Plusieurs facteurs influencent la coagulation présure : parmi ces facteurs, on peut citer la concentration en enzyme, la température, le pH et la concentration en ions Ca^{2+}**(Larsson et Andren, 1999 ; Vliet *et al.*, 2004 ;Candioti *et al,*2004 ; Anema *et al.*,2005 ; Guyomarc, 2006).**

Dans le processus de la coagulation du lait, la chymosine a une double action. Une action coagulante par hydrolyse de la caséine κ et une protéolyse générale sur toutes les protéines au cours de l'affinage du fromage **(Abi Azar, 2007 ; Adoui, 2007).** L'enzyme hydrolyse la liaison Phe105 et Met106 de la κ -caséine, entraînant la déstabilisation des micelles de caséines et leur coagulation. L'hydrolyse des caséines par la présure fournit des substrats pour la formation de saveurs pendant la maturation du fromage. Bien que la protéolyse soit essentielle pour la fabrication de fromages

affinés, un bon coagulant doit posséder un bon rapport d'activité de coagulation sur l'activité protéolytique générale **(Yegin et Dekker, 2013).**

- **La concentration en enzyme**

Comme toute réaction enzymatique, la concentration en enzyme a une grande influence sur le processus de coagulation présure. Cette coagulation est le résultat d'une réaction d'hydrolyse enzymatique suivie d'une réaction d'agrégation des protéines **(Van Hooydonk et Walstra, 1987).** Le temps de coagulation diminue avec l'augmentation de la concentration en enzyme **(McMahon *et al.*, 1984 ; Carson *et al.*, 1987).** Certains auteurs ont observé aussi une augmentation de la fermeté du gel associée à l'augmentation de la concentration en présure **(Zoon et *al.*, 1988).**

- **La température**

La coagulation enzymatique du lait est fortement dépendante de la température. La vitesse de formation du coagulum augmente progressivement de 20 à 40-42 °C. En dessous de 10 °C, la gélification ne se produit pas. L'effet le plus important de la baisse de la température est la solubilisation du phosphate de calcium micellaire à une température plus élevée, le processus de coagulation ralentit. Il s'arrête à 55 °C.

Après un chauffage, il y a une augmentation du temps de gélification par la chymosine accompagnée d'une diminution de la fermeté du gel formé. D'après leur étude, le chauffage a un léger effet au niveau de la phase primaire (enzymatique) de la coagulation, tandis que son effet reste marqué au moment de la phase secondaire (phase d'agrégation des protéines) **(Alloggi et *al.*, 2000 ; Najera *et al.*, 2003 ; Anema *et al.*, 2005).**

- **Le pH**

L'influence du pH sur le temps de coagulation et la vitesse de raffermissement du caillé est très forte **(Pires *et al.*, 1999 ; Awad, 2005).** Le pH optimal d'hydrolyse de la κ- caséine se situe entre 5,1-5,3 **(Humme, 1972 ; Lopez et *al.*,1998 ; Zbikowska et *al*, 2004)** L'effet le plus important de l'abaissement du pH est la solubilisation du phosphate de calcium micellaire **(Visser *et al*, 1980 ; Le Graet et Brule., 1993)** ainsi que la diminution de la charge nette de la molécule de caséine, suivi de la dissociation de la caséine des micelles. L'abaissement du Ph augmente la vitesse de raffermissement du caillé **(Daviau *et al.*, 2000).**

- **La concentration en ions Ca^{2+}**

La composition minérale du lait va affecter la coagulation et tout particulièrement la quantité de calcium ajouté au lait. En effet, le temps de prise diminue tandis que le taux de raffermissement et la fermeté du gel vont augmenter jusqu'à des concentrations de CaCl2 d'environ 0,01 M. On attribue cet effet à l'augmentation d'ions calcium. Cependant, à des concentrations supérieures, on observe un phénomène inverse pour chacun des paramètres de coagulation **(St-Gelais et Tirard-Collet, 2002).** Le calcium n'est pas requis dans la phase initiale d'hydrolyse enzymatique mais est essentiel à l'agrégation des micelles. L'ajout de CaCl2 en technologie fromagère stimule la coagulation, le raffermissement du caillé et permet de réduire les pertes dans le lactosérum, tout en diminuant le pH et réduisant la charge de la micelle **(Roupas, 2001).**

I .2.Les succédanés de présure

La forte demande de la présure par les industries fromagères et le prix relativement élevé de ce coagulant ont conduit à l'approvisionnement de plus en plus difficile de la présure traditionnelle. Par ailleurs, dans certains pays, pour des raisons philosophiques ou religieuses, l'utilisation de la présure est interdite. A cet égard, des recherches ont été entreprises, ces dernières années, afin d'exploiter d'autres sources potentielles de coagulases, capables de remplacer la présure désignées sous le terme de succédanés de présure.

-Propriété spécifique exigées du succédané de présure

Selon **Ramet (1997),** les enzymes de remplacement de la présure doivent répondre aux critères suivants :

- ✓ Une bonne solubilité dans l'eau.
- ✓ Une odeur et une couleur faibles ou nulles.
- ✓ Une activité coagulante bonne et une durée de consommation raisonnable.
- ✓ Une absence de toxicité pour le consommateur et un degré de pureté élevé pour éviter tout accident de prolifération de microorganismes indésirables.

La synérèse du coagulum au cours de l'égouttage et les modalités de l'affinage devrait permettre d'obtenir les caractéristiques usuelles des fromages dans un délai sensiblement égal à celui de la présure.

- Les rendements fromagers doivent être très proches ou supérieurs à ceux révélés lors de l'emploi de la présure.

I .2.1Enzymes coagulantes d'origine animale

Des substituts de présure sont produits par plusieurs mammifères comme le chameau **(Elagamy, 2000 ; Siboukeur, 2005),** le buffle **(Mohanty *et al*., 2003)** et même par les viscères de poissons **(Guérard, 1987).** L'étude comparative des activités coagulantes et protéolytiques de ces enzymes a révélé qu'elles présentent des caractéristiques proches de celles de la présure **(Polaina et Mac Cabe, 2007).**

De nombreuses protéases d'origine animale ont fait l'objet d'expérimentation en vue d'une utilisation potentielle en fromagerie. Cependant toutes ne sont pas pour autant aptes à la fabrication fromagère ; seules les pepsines porcines et bovines présentent un intérêt industriel **(Eck, 1987).**

a. La pepsine bovine

La pepsine bovine est extraite à partir des caillettes d'animaux adultes et de veaux sevrés. L'extrait brut contient un pepsinigène majoritaire et plusieurs pepsinogènes mineurs qui donnent après activation à pH 2,0 la série de pepsines correspondant **(Chow et Kassell, 1968).Antonini et Ribadeau-Dumas (1971)** ont pu révéler la présence d'une pepsine I et d'une pepsine II dans l'extrait activé de caillette de bœuf, issus de deux zymogènes différents. La pepsine I est un constituant mineur **(Antonini et Ribadeau-Dumas, 1971).** Les propriétés protéolytiques de la pepsine bovine sur les caséines sont plus semblables à celles de la chymosine **(Ernstrom et Wong, 1983 ; Barbano et Rasmussen, 1992).** En outre, son activité coagulante est moins dépendante du pH, contrairement à la pepsine porcine et elle provoque la coagulation du lait à pH 6,9 **(Ernstrom et Wong, 1983).**

b. La pepsine porcine

L'extraction et l'utilisation de la pepsine porcine ont débuté durant la première guerre mondiale pour pallier une pénurie de la présure, mais n'a été réellement industrialisé qu'à partir des années 60. Elle est extraite de l'estomac de porcs sous forme inactive, puis activée par acidification à pH 2, son poids moléculaire est de 34500 Da **(Ernstrom, 1983).**L'emploi de la pepsine porcine présente pour la

coagulation du lait des difficultés, à cause d'une activité protéolytique supérieure à celle de la présure, avec présence d'arrière-goût et d'amertume pour certains fromages **(Brulé et Lenoir, 1997).**

I 2.2.Enzymes coagulants d'origine végétale

Contrairement à la présure qui est spécifique à la κ-caséine, les *aspartyl-protéases* des plantes peuvent hydrolyser les caséines α, β et κ, ce qui provoque une acidité excessive **(Simöes et Faro, 2004).** Plusieurs préparations coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures **(Ramet, 1997).**

Cependant il a été conclu que cet agent coagulant se caractérise par une activité protéolytique excessive ce qui confère un goût amer au fromage. D'autres végétaux fournissent des coagulases telles que les ficines extraites du latex du figuier, la papaïne du papayer, la bromelaine de l'ananas. L'activité coagulante de ces préparations végétales est très variable car elle est fortement influencée par l'état de maturité de la plante et par les conditions de collecte et de stockage .De ce fait, l'emploi de ces protéases coagulantes est toujours resté limité aux aires locales de production **(Eck, 1987).**

I 2.3.Enzymes coagulants d'origine microbienne

Le développement de la biotechnologie a provoqué un regain d'intérêt pour la production, à partir de micro-organismes, de protéases susceptibles de remplacer la présure.

Parmi les avantages que présentent les enzymes de fermentation par rapport à ceux d'origine animale et végétale, on peut citer :

- La croissance rapide sur substrat bon marché.
- La production illimitée d'enzymes en utilisant des techniques simples. La quantité produite dépend du volume de la culture mis en œuvre ; elle n'est donc pas tributaire d'une source de matière première fluctuante ou à approvisionnement difficile.
- La culture rapide avec un bon rendement pouvant être augmenté par amélioration génétique des souches, la maitrise et l'optimisation des conditions de fermentation.
- La conservation des propriétés sécrétrices des souches dans le temps.

- Ces avantages l'emporter sur les inconvénients liés aux industries de fermentation (investissement lourd, consommation d'énergie, risque de contamination, etc.…).

Actuellement, la recherche sur les présures microbiennes est toujours dirigée vers ladécouverte d'enzymes qui sont plus thermolabiles et ayant un meilleur rapport de coagulation surl'activité protéolytique générale. La thermolabilité est un critère important, en particulier pour lesprotéases ayant une activité protéolytique générale élevée **(Yegin et Dekker, 2013).**

a. Enzymes coagulants d'origine fongique

Ces dernières années, de très nombreux travaux sont portés sur la recherche de protéase d'origine fongique, qui au plan pilote, ont donnés très tôt des résultats souvent comparables et parfois supérieurs à ceux obtenus avec la présure, et ont été rapidement validés en fabrication industrielle.

Différentes préparations sont commercialisées sur le marché international par les laboratoires spécialisés et sont employées à plus ou moins grande échelle selon les pays **(Wahba et El-Abassy, 1989 ; Eck et Gillis, 1997**). Parmi les espèces fongiques à pouvoir coagulant, seules trois moisissures sont exploitées par les grandes usines de fermentation en vue de la production de coagulases.

-*Le Mucor Pusillus* produit une coagulase avec un rendement élevé seulement en culture solide **(Aunstrup, 1980).**C'est une moisissure banale mésophile du sol, de laquelle la firme Japonaise Metto-Sangyo, a extrait une préparation commercialisée par Noury.

-*Le Mucor Miehei* est adapté à la fermentation submergée. Il secrète une protéase acide à aspartate ayant un poids moléculaire d'environ de 38 000 Da et contient une seule chaine peptidique avec 6% de carbohydrates. L'extrait coagulant est commercialisé par :

- ✓ La firme Française Rapidase sous la dénomination Fromase.
- ✓ La Danoise NOVO sous le nom de Rennilase.
- ✓ La firme Américaine MILES sous l'appellation de Marzyme.
- ✓ La firme Danoise Boll Hansen sou le nom de Hannilase.

-*L'Endothia parasitica*, parasite du châtaignier, est cultivée en culture submergé. La préparation coagulante, est commercialisée sous le nom de « Suparen ».Ces préparations enzymatiques ont été soumises à des contrôles hygiéniques est toxicologiques sévères afin de déterminer l'absence d'antibiotiques et d'aflatoxines **(Noor-Deviliet *et al.*, 1983).**

b. Enzymes coagulants origine bactérienne

De multiple espèce de bactéries ont été étudiées notamment dans les genres Bacillus et Pseudomonas tels que *Bacillus cereus, Bacillus polymyxa, Bacillus subtilis*. Les résultats ont été en général décevants en raison de l'activité protéolytique généralement très élevée de ces protéases par rapport à celle de la présure. La protéase de *Bacillus cereus* dégradait rapidement la caséine entière. Du cheddar préparé par la protéase de *Bacillus subtilis* présentait une flaveurs acceptable ; cependant, le rendement était très faible suite à une protéolyse excessive **(Ramet, 1997).**

- ✓ **Le genre *Bacillus :***

Les membres de la famille des *Bacilliaceae*s figurent parmi les bactéries les plusabondantes sur terre, en raison de leurs capacités de former des endospores résistantes. Cettefamille réunie 62 genres bactériens dont le plus grand est le genre de Bacillus qui enfermeenvirons 226 espèces du totale de 457 autre espèces qui englobe cette dernière (**Mandic et *al.*, 2017**).Les Bacillus sont des germes fréquemment isolés à partir des niches écologiques très variées(des sols, plantes, eaux douces, eaux de mers.). Le sol constitue l'habitat principal de ce genrebactérien où ils sont impliqués dans le cycle du carbone et de l'azote (**Goldman et Green, 2009**). Le genre Bacillus sont des hétérotrophes saprophytes capables de dégrader une largegamme de substances carbonés polymères et simples (**Mandic et *al.*,2017**).

. Ce sont des bacilles à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 à 1,2 µm de diamètre et une longueur de 2,5 à 10 µm), à coloration de Gram positive, capable de produire des endospores (forme de résistance et critère important sur le plan taxonomique du genre *Bacillus*), ce sont des bactéries qui se cultivent en aérobiose (aéro- anaérobie, ou aérobie stricte), mobiles grâce à une ciliature péritriche sauf *Bacillus anthracis*.

Ils possèdent une catalase très active et se cultivent facilement sur milieu ordinaire car ce ne sont pas des germes exigeants **(Garrity *et al.*, 2004).**

- ✓ ***Bacillus amyloliquefaciens***

-Définition

C'est une bactérie gram (+) du genre *Bacillus* ; elle se développe d'une façon optimale de 30 à 40 °C .Elle est de 0.7 à0.9 µm de diamètre, pourvu d'une ciliature péri triche et cesse à se développer hors de 15 à 50 °C et réduit le nitrate en nitrite. Elle produit la subtilisine qui dégrade les protéines et l'alpha amylase pour dégrader l'amidon **(Priest *et al.*,1987).**Cette bactérie est très connu pour ses activités cataboliques et dégradation des macromolécules complexes notamment les protéines extracellulaires. Elle se trouve dans le sol et la nature.**(**Voir**figure 01).**



Figure 01 : Observation de *Bacillus amyloliquefaciens* sous microscope électronique

- ✓ **Intérêt industriel**

Bacillus amyloliquefaciens est largement utilisé dans le secteur agricole, pharmaceutique, et les industries alimentaires. Plus précisément, *B. amyloliquefaciens* est utilisée comme un *rhizobacterium* favorisant la croissance végétale en raison de sa capacité à stimuler la croissance des plantes. Elle est utilisée pour supprimer les

agents pathogènes qui sont transmis par le sol par sa capacité à produire des antifongique et métabolites antibactériens (par exemple, lipopeptides et polycétides). (**Fan *et al.*, 2011).**

De plus, *B amyloliquefaciens* est utilisée pour la production industrielle d'enzymes, y compris les sérines protéases et les alphas amylases et d'autres produits, tels que les nucléosides puriques et riboflavine.

- ✓ **Production des amylases chez le genre *Bacillus***

Le métabolisme et la physiologie des bactéries appartenant au genre Bacillus est très bien étudiée. Certaines espèces sont dotés d'un statut Gras (Generally Recognized as Safe), possèdent de bons systèmes d'exportation de protéines et peuvent produire certaines enzymes extracellulaires telles que les amylases, xylanases, protéases à des concentrations de l'ordre de 20-25 g/L **(Schallmey *et al.*, 2004).**

La production des enzymes par les espèces appartenant au genre *Bacillus* représente environ 50% de la taille totale du marché mondiale. Vue le taux important des protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire, les espèces de *Bacillus* sont également de excellents candidats producteurs des amylases **(Emanuel *et al.*, 2009)**.Les amylases sont été élaborées à partir de différentes espèces telles que *Bacillus megaterium, Bacillus licheniformis* **(Oyeleke, *et al.*,2010)**, *Bacillus subtilis* **(Riaz *et al.*, 2003)**.

- ✓ **Production de protéase chez le genre *Bacillus***

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines. La protéase neutre de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges d'enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (**Aviron-Violet *et al.*, 1982)**. Une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argent à partir des films photographiques par hydrolyse de la gélatine (**Sumantha *et al.*, 2006**). Les bactéries appartenant au genre de Bacillus sont de loin les bactéries les plus utilisées pour la production des protéases car elles sont considérées comme de bons hôtes pour ce secteur industriel (**Pinches et *al* .,1985).**

I 2.4.La chymosine produite par génie génétique

Les présures provenant d'animaux comme le chameau, la chèvre, l'agneau, et le buffle ont été étudiées et caractérisées afin de remplacer la présure bovine. Toutefois, elles ne sont pratiquement pas utilisées au niveau industriel, car ces enzymes présentent des propriétés enzymatiques moins intéressantes en comparaison de celles de la présure bovine **(Almeida *et al.*, 2015 ; Yegin et Dekker, 2013).** En réponse à la croissance de la production fromagère et pour surmonter les problèmes de disponibilité de la présure animale, la « Food and Drug Administration » a approuvé, dans les années 1990, l'utilisation de chymosine dérivée de microorganismes génétiquement modifiés comme *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Lactococcus lactis, Saccharomyces cerevisiae* qui sont utilisés comme hôtes pour l'expression des enzymes recombinantes **(Jacob *et al.*, 2011).** Les présures recombinantes représentent actuellement 70 à 80% du marché mondial de la présure **(Johnson, 2006 ; Jacob, 2011).** Différentes études ont prouvé que la chymosine recombinante et la chymosine de veau standard se comportent de la même façon dans toutes les conditions étudiées. Aucune différence entre les fromages n'a été observée du point de vue sensoriel et chimique **(Yegin et Dekker, 2013).** Bien que les présures recombinantes aient fait leurs preuves comme substituts à la présure bovine, une attention de plus en plus grande est portée aux enzymes naturelles extraites de plantes **(Chazarra, 2007).**

II. Le lait

II. 1.Définition

II.1.1. Définition alimentaire

Selon **Goursaud, (1985),** le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires de femelles mammifères telles que la vache, la chèvre et la brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant. Ce dernier est un liquide de composition complexe, opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en β carotènes. Il a une odeur peu marquée, mais caractéristique. Son goût, variable selon les espèces animales, est agréable et douceâtre.

II .1.2. Définition réglementaire

En 1909, le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini par le Congrès International de la Répression des Fraudes, comme étant le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum. **(Goursaud, 1985)** Très tôt l'accent fut mis sur la qualité sanitaire du lait et l'état de bonne santé des animaux, comme en témoigne cette définition**.**

II.2.Caractéristiques du lait

II.2.1. Caractères organoleptiques

- La couleur : Le lait est un liquide blanc mat, opaque à cause des micelles de caséinates, parfois bleuté ou jaunâtre du fait de la beta carotène ou de la lactoflavine contenues dans la matière grasse. (**Jacques, 1998**)

- L'odeur : Le lait a une odeur toujours faible Sui generis (caractéristique de l'animal qui l'a produit), agréable et variable en fonction de l'alimentation. **(Chetoune, 1982).**

- La saveur : Le lait a une saveur douceâtre, faiblement sucrée en raison de la richesse en lactose dont le pouvoir sucrant est inférieur à celui du saccharose **(Horola, 2002).**

- La viscosité : La viscosité est fonction de l'espèce, c'est ainsi que l'on distingue :

-Un lait visqueux chez les monogastriques (jument, ânesse, carnivores, et femme etc.)

- Un lait moins visqueux chez les herbivores (lait de brebis plus visqueux que celui de la vache) **(Seydi, 2004).**

II.2.2. Caractéristiques physico-chimiques

Selon **Mahaut *et al.*, (2003)**, les principales caractéristiques physico-chimiques du lait sont :

-Masse volumique à 20 °C ……..……. 1028 – 1034 kg/m3.

-Point de congélation …… - 0, 555 °C.

-pH …… 6,6 à 6,8.

-Acidité titrable...…… 15 à 18 °D.

-Point d'ébullition …… 100,5 °C.

II.3.La composition du lait

II.3.1 L'eau

Le lait contient en moyenne 875 g l-1 d'eau. Cette eau se trouve sous deux états :

- l'eau extra micellaire : représente environ 90% de l'eau totale, et contient la quasi-totalité du lactose, des sels minéraux solubles, de l'azote soluble, etc... Une petite partie de cette eau est liée aux éléments hydrosolubles, dont les protéines solubles.

- l'eau inter micellaire : représente environ 10% de l'eau totale ; une fraction de cette eau est liée aux caséines et l'autre conserve des propriétés solvants, mais les transferts de cette eau dans les opérations de déshydratation et hydratation seraient beaucoup plus lents **(Mahaut *et al.*, 2003).**

II.3.2.Glucides

Le sucre principal du lait est le lactose, disaccharide constitué par l'association d'une molécule de glucose et d'une molécule de galactose. On ne relève que 70 $mg.L^{-1}$ de glucose et 20 $mg.L^{-1}$ de galactose ainsi que des traces d'autres glucides.

Le lait contient une cinquantaine d'oligosaccharides bien répertoriés présents à l'état libre, mais en quantités souvent négligeables (0,1 g/litre**) (FAO, 2002).**

Le constituant principal de la matière sèche du lait est le lactose qui présente une moyenne de 50 g/l **(Linden et Lorient, 1994)**

D'autres glucides peuvent être présents en faible quantité, comme le glucose et le galactosequi proviendrait de l'hydrolyse du lactose, en outre certains glucides peuvent se combiner aux protéines **(Amiot *et al*., 2002).**

II .3.3. Lipides

Les lipides du lait n'ont aucun rôle dans le phénomène de coagulation. Ils sont constitués en majeure partie de triglycérides qui représentent 97 à 99% des lipides totaux. Ces lipides se solidifient à température ambiante **(Boyaval,1995).**

La composition des lipides du lait varie avec l'espèce ; 35g/l environ pour celui de la femme et de la vache ; 40 à 50 g/l pour les autres espèces.

En plus des triglycérides, on trouve des phospholipides, stérols cholestérol notamment qui constituent le reste (1 à 3 % des lipides totaux) **(Linden et Lorient, 1994).**

II.3.4. Vitamines

Le lait ne permet pas de satisfaire tous les besoins vitaminiques. Ce sont surtout les vitamines A, B1 et B2 qui constituent la valeur nutritive du lait **(Huppertz *et al.*, 2006).**

II.3.5. Matières minérales

La quantité des minéraux contenue dans le lait après incinération varie de 0,60 à 0,90% **(Vignola, 2002).** Les principaux sont le potassium, le calcium, le chlore, le phosphore, le magnésium, et le sodium. On note également la présence des oligo-éléments **(Alias, 1974 ; Huppertz *et al* ., 2006 ; Jeantet *et al.* , 2008)**. Ils se trouvent sous deux formes principales, surtout sous forme de sels ionisés et solubles dans le sérum et sous forme micellaire. Les éléments basiques majeurs (Ca, K, Mg et Na) forment des sels avec les constituants acides qui sont les protéines, les citrates, les phosphates et les chlorures **(Vignola, 2002 ; Mahaut *et al*., 2003).**

II.3.6. Matières azotées

On distingue deux groupes de matières azotées dans le lait : la matière azotée protéique et la matière azotée non protéique.

II.3.6.1. Azote non protéique (ANP)

L'azote non protéique représente en moyenne 5% de l'azote total du lait et se présente sous forme d'urée, créatine, créatinine, ammoniaque, acides aminés libres, vitamines et nucléotides. **(Mahaut *et al*., 2003).**

II.3.6.2. Azote protéique

Technologiquement, les protéines du lait sont probablement les constituants les plus importants du lait. La recherche sur des protéines du lait remonte au début du 19ème siècle Ils Sont probablement les mieux caractérisées de toutes les protéines alimentaires. Les protéines du lait peuvent être divisées en deux classes selon leurs solubilité à pH 4,6, les protéines insoluble à pH 4.6 s'appellent les caséines et les protéines solubles à pH 4.6 sont les protéines de sérum ou les protéines de petit lait **(FOX, 2003 ; Huppertz *et al.*, 2006).**

II.3.6.2.1. Les protéines de sérum

Les protéines de sérum représentent environ 20% des protéines totales. Elle se trouve sous forme de solution colloïdale. Les deux principales sont β-lactoglobuline et α-lactoglobuline, les autres protéines du sérum sont des immunoglobulines, le sérum albumine bovine (SAB) et la lactoferrine. En plus de ces protéines, des enzymes sont présentes dans le sérum **(Walstra *et al.*, 1999 ; Vignola, 2002 ; Huppertz *et al.* , 2006).**

II.3.6.2.2. Les caséines

Les caséines représentent 80% des protéines totales du lait et se composent de quatre protéines majeures, les caséines αs1, αs2, β, et la caséine-κ**.** Leur point isoélectrique est de 4,65 **(Brule *et al.*, 1997 ; Jeantet *et al.*, 2008).** Il existe également une caséine γqui est formée par l'hydrolyse de la caséine β par le plasmide. Les micelles de caséines sont constituées de 92% de protéines et de 8% de minéraux **(Vignola, 2002),** Il existe plusieurs variantes génétiques pour les caséines et leur fréquence est plus ou moins importante selon les espèces **(Grosclaude, 1988).**

II.3.6.2.2. 1.Caractères généraux des caséines

- Caséine αs

Cette caséine, présente en quantité modeste (8 à 11%), possède 207 acides aminés La fraction α s'est révélée hétérogène. L'ensemble des fractions αs2, αs3, αs4, αs5 et αs6 est maintenant nommé caséine αs2. Le poids moléculaire est situé entre 24000 et 30000 Daltons. Elle est fortement sensible au calcium à toute température et est la plus hydrophile de toutes les caséines vu sa richesse en groupements phosphorylés et en résidus cationiques. **(Jouanp, 2002).**

- Caséine β

Elle est présente en quantité importante (25–35%), et possède 209 acides aminés, pour une masse molaire d'environ 24000 Daltons. Elle est sensible au Ca2+ à température ambiante. A basse température, en dessous de 10°C, elle reste soluble en présence de calcium. C'est la plus hydrophobe des caséines. La molécule présente un caractère amphipolaire très marqué : partie N terminale très polaire (1/3 de la molécule) et partie C terminale hydrophobe comprenant les 2/3 restants de la molécule**. (Jouanp, 2002).**

-Caséine κ

Sa structure primaire comporte 169 résidus d'acide aminés, son poids moléculaire est de 19000 Daltons. Lors de l'hydrolyse de la liaison Phe 105-Met106 par la chymosine, il y a libération du caséino macropeptide (CMP) ou s'il est fortement glycosylé, glycomacropeptide (GMP) et la para caséine κ. La fraction CMP ou GMP confère à cette protéine son caractère hydrophile et la para caséine κ son caractère très hydrophobe. Ceci explique la perte de la solubilité des micelles de caséines. **(Mahaut *et al.*, 2000 ; Vierling, 2003).**

-Caséine γ

La connaissance de la structure de la caséine β permet de montrer que la fraction γ est constituée de 3 fragments appelés γ1 (20500 Daltons), γ2 (11800 Daltons), γ3 (11500 Daltons) qui proviennent de l'hydrolyse de la caséine β par laplasmine, une protéase endogène alcaline du lait. **(Mahaut *et al.*, 2000 ; Vierling, 2003).**

II.3.6.2.2.2.Micelle de caséine

La micelle de caséine est une particule sphérique d'un diamètre moyen de 50 à 200 nm **(figure 02)** formée par l'association des caséines (αs1, αs2, β, κ), de quelques fragments peptidiques (caséines γ issus de la protéolyse de la caséine β par la plasmine) et de composants salins dont les deux principaux sont le calcium et le phosphore. La masse des micelles oscille entre 2.108 et 2.109 Daltons. Les associant qui constituent la micelle, sont appelées des submicelles. Elles étaient révélées, par microscope électronique après cryofracture, et sont d'environ 10 nm de diamètre. Leur masse moléculaire serait en moyenne de 3.105 Da. De nombreux modèles ont été proposés. Les uns accordent à la micelle une structure globale avec une répartition non uniforme des constituants ; d'autres retiennent l'idée d'une structure avec sous-unité ou submicelle. Ces submicelles s'agrègent entre elles principalement par des liaisons phosphocalciques et secondairement par le magnésium et le citrate **(Cayot et Lorient, 1998 ; Mahaut*et al*., 2000).**

Les submicelles à faible teneur en caséine κ sont localisées à l'intérieur de la micelle ; celles, riches en caséines κ sont présentes à l'extérieur. Les submicelles périphériques riches en caséines κ comporteraient des chaînes flexibles. Ces chaînes correspondant aux fragments COOH terminal des caséines κ auraient un rôle déterminant dans la stabilité des micelles **(Brule *et al* ., 1997; Dalgleish, 1998 et Dalgleish,2007).(**voir **figure 02).**

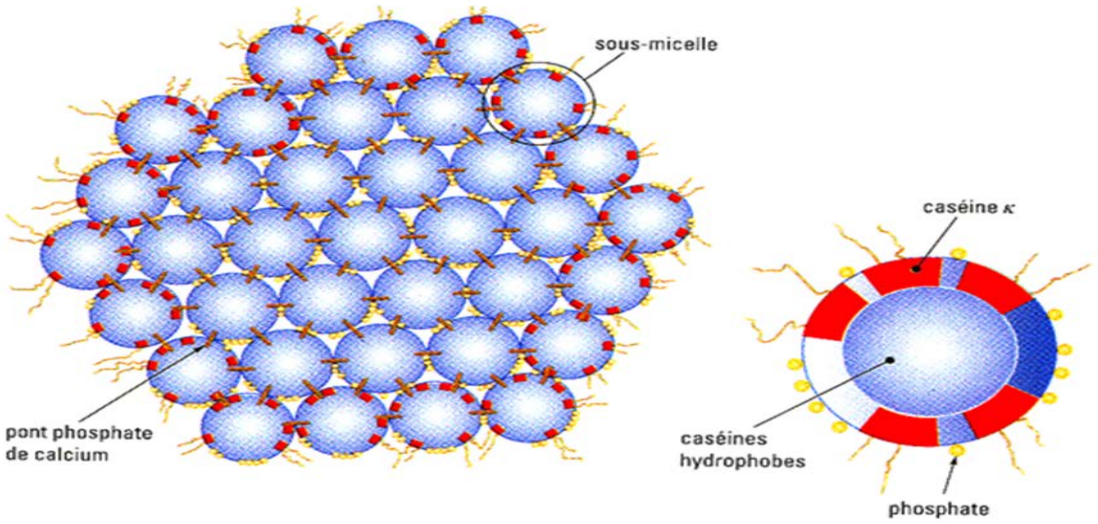


Figure 02 : Modèle de micelle de caséine avec sous-unités **(Amiot *et al.*, 2002).**

III. Fromage

III.1. Définition

Solon **le codex** alimentaires, (2013) Le fromage est définie comme étant un produit affiné ou non affiné, de consistance molle, semi dure ou extra dure qui peut être enrobé et dans lequel le rapport protéines de lactosérum/ caséines ne dépasse pas celui du lait. Il est obtenu par :

- ❖ coagulation complète ou partielle des matières premières suivantes : lait et/ou produits obtenus à partir du lait, grâce à la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par égouttage partielle du lactosérum résultant de cette coagulation.
- ❖ Par l'emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation du lait et/ou produits provenant du lait.

- ➢ **Fromage affiné**

C'est un fromage qui n'est pas prêt à la consommation peu après sa fabrication, mais qui doit être maintenu pendant un certain temps à la température et dans les conditions nécessaires pour que s'opèrent les changements biochimiques et physiques caractéristiques du fromage.

- ➢ **Fromage affiné aux moisissures**

C'est un fromage affiné où l'affinage est provoqué essentiellement par la prolifération de moisissures caractéristiques dans la masse et/ ou sur la surface du fromage.

- ➢ **Fromage non affiné**

C'est le fromage frais est un fromage prêt à la consommation peu de temps après sa fabrication.

III.2.Composition moyenne du fromage

Le fromage est un aliment de base, riche en graisses, protéines, calcium etphosphore,à Longue conservation en comparaison de la durée de conservation du lait à partir duquel il est fabriqué voir (**Tableau01).**

Tableau 01 : Composition moyenne du fromage **(Abdoune, 2003)**

Composés	Fromage
Eau	Eliminée en partie par la fabrication et sa teneur varie de : • 35 % (pâte cuite dure) • 50% (pâte molle) • 80 % (fromage frais)
Glucides	pratiquement éliminé avec l'eau par la fabrication
Lipides	se retrouvent dans la majorité des fromages sauf les fromages maigres : • 23%fromages à pâte molle • 30%fromages à pâte dure
Protéines	La caséine coagulant avec la présure, est l'élément essentiel de tous les fromages (même maigres) : • 18% fromages à pâte molle • 19% fromages blancs au lait écrémé • 24% fromages à pâte ferme.
Minéraux	Grande richesse en calcium et en phosphore, surtout dans les fromages à pâte ferme rapport Ca/P=1,26 en moyenne, donc aliment recalcifiant;-Plus en moins riche en chlorure de sodium selon leur fabrication(adjonction du sel, pâte lavée à l'eau salée, etc...)
Vitamines	fromages fermentés à pâte molle, notamment les fromages bleus, sont de bonnes sources de vitamine B, du fait des synthèses réalisées par les moisissures. -se retrouve dans le fromage selon la teneur en matière grasses.

III.3.Conditions nécessaires à la fabrication fromagère

Les conditions nécessaires et favorables à un déroulement de la fabrication fromagère sont les suivantes :

- ❖ L'activité coagulante doit être bonne dans les conditions physiques et chimiques rencontrées dans les laits soumis à la transformation : pH, température, force ionique, concentration en substrat caséine, absence d'inhibiteurs enzymatique.
- ❖ Le comportement rhéologique du gel après floculation doit permettre d'effectuer les traitements de l'égouttage dans un délai acceptable et d'obtenir un fromage présentant les caractéristiques de compositions et de rendement souhaitées.

Les modalités de l'affinage doivent conduire à une évolution des propriétés (**Simon et *al,* 2002**).

III.4. Etapes de fabrication du fromage

La transformation du lait en fromage a permis de conserves des éléments nutritifs du lait sur des périodes plus ou moins longues (**Gelais et Tirard, 2009)**.

Le processus fromagère début avec la préparation du lait, les deux étapes principales de l'élaboration d'un fromage sont ensuit la coagulation et l'égouttage suivi accessoirement de l'affinage après salage.

III.4.1 .Préparation du lait

Comprend éventuellement une phase de traitement thermique du lait voire une étape de maturation.

Le fromage peut également ajuster les taux de matière grasse (écrémage partielle, apport de matière grasse) et azoté (ajouté de poudre de lait) (**Catherine, 2005**).

III.4.2 .Coagulation

La coagulation du lait est une étape importante dans le processus de fabrication du fromage. Il s'agit de la transformation du lait liquide en un gel, appelé aussi coagulum ou caillé qui, après un certain nombre de transformations, deviendra un fromage.

La coagulation peut être obtenue par abaissement du pH (acidification), par action des enzymes coagulantes ou par action mixte.
On distingue donc trois types de coagulation (**El-Bendary *et al.,* 2007 ; Shieh *et al.,* 2009 ; Mohamed Ahmed *et al.,* 2010**).

III.4.2.1.Coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique (pHi =4,6) soit :

- par acidification biologique à l'aide de bactéries productrices d'acide lactique (bactéries lactiques contaminant à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levains) **(Mahaut *et al.,* 2005).**
- par acidification chimique (injection de CO2 addition de glucono delta lactone)

(Mahaut *et al.,*2000).Voir **(figure 03).**
Le gel formé présente une perméabilité satisfaisante, mais une friabilité élevée avec une élasticité et plasticité pratiquement nulles dues au manque de structuration du réseau.

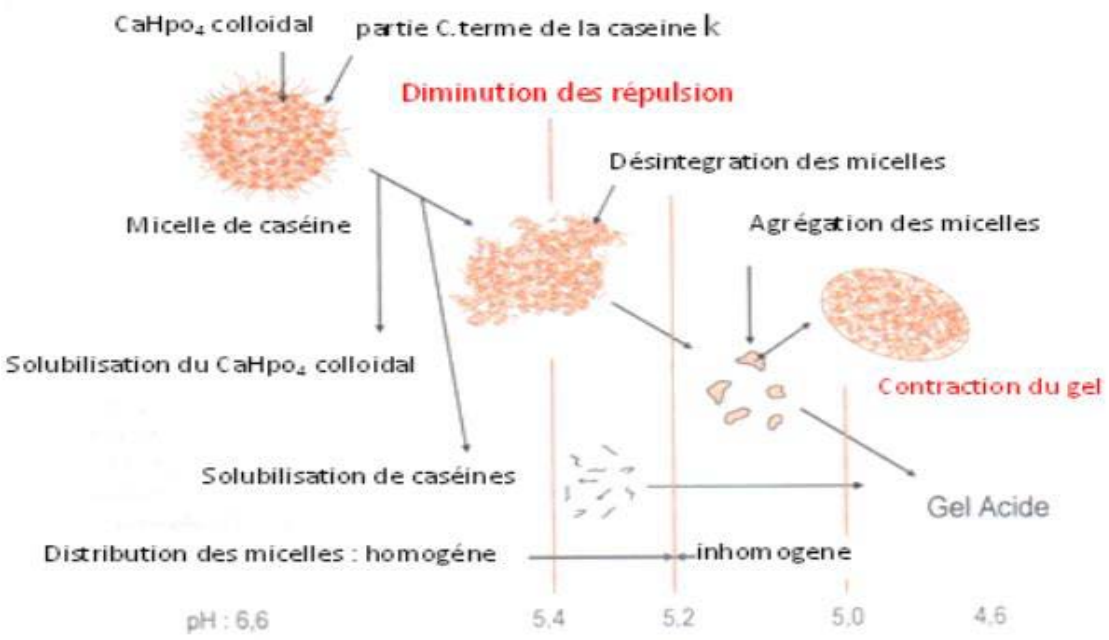


Figure 03: Modification de la structure micellaire au cours de l'acidification (Jeantet, 2007)

III.4.2.2.Coagulation enzymatique

Il s'agit de l'action de la présure (plus précisément de la chymosine) qui va hydrolyser préférentiellement la caséine κ en un site préférentiel de coupure.

La coagulation de type présure a généralement lieu pour des pH compris entre 6.2 et 6.7 : pH pour lesquels la déminéralisation de la micelle est nulle ou faible. Dans ces conditions, la structure de la micelle est stabilisée**. (Lenoir *et al.*, 1985), (**voir **figure 04).**

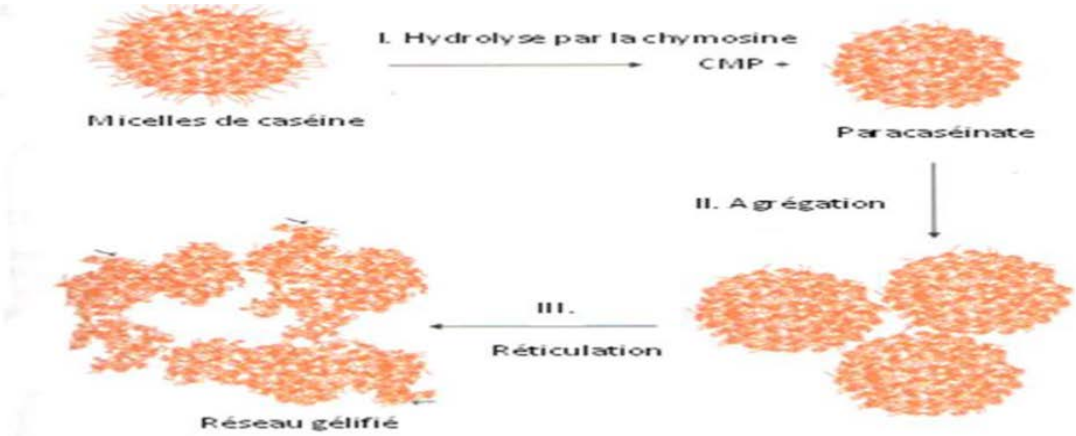


Figure 04 : Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation présure(Jeantet, 2007).

III.4.2.3.Coagulation mixte

Ce type de coagulation consiste en l'action de la présure et l'acidification du lait. C'est la voie la plus utilisée dans les industries fromagères en particuliers pour la fabrication des fromages frais (petit suisse, demi sels....) et des fromages à pâte molle (Camembert, Brie...) (**Green, 1977 ; Cheftel, 1980 ; wigley 1996)**

Dans les deux cas, après formation de coagulum, celui-ci s'exsude et se détache du lactosérum : c'est la synérèse de caillé ou égouttage. Ce phénomène de synérèse est rapide pour le coagulum par emprésurage et lent pour le coagulum acide **(Lenoir, 1985)**

III.4.2.3.1. Mécanisme d'action de la coagulation

Selon **Mahaut *et al*, (2003)** on distingue 3 phases de coagulation :

- Phase primaire ou hydrolyse enzymatique.
- Phase secondaire ou agrégation des micelles.
- Phase tertiaire ou réticulation du gel.

➢ **Phase primaire**

La phase enzymatique correspond à une protéolyse limitée de la caséine κ, portant sur la liaison Phe105-Met106.

La chaîne peptidique de la caséine κ est ainsi coupée en 2 segments de caractéristiques différentes :

- Le segment 1-105 ou paracaséine κ est hydrophobe, basique et reste intégré la micelle.
- le segment 106-169 ou caséinomacropeptide (CMP) est très hydrophile, acide et passe dans le lactosérum Lorsque le CMP se détache de la caséineκ, il se produit une réduction des charges négatives de la micelle ainsi que son degré d'hydratation par la perte de sa partie hydrophile. Du fait de la suppression de ces deux facteurs essentiels dans la stabilité des caséines en solution, des liaisons peuvent alors s'établir entre les micelles modifiées, permettant leur agrégation et finalement la formation d'un gel, c'est la phase de coagulation proprement dite. **(Fox *et al., 2000* ; Mcsweeney, 2004)**.

➢ **Phase secondaire**

A pH 6,6, lorsque 80 à 90% de la caséine κ est hydrolysée (correspondant à 60% du temps nécessaire pour observer virtuellement la coagulation), l'agrégation se met en place par des liaisons électrostatiques et hydrophobes entre les micelles modifiées **(Mahaut *et al* ., 2000).**

- **Phase tertiaire**

L'agrégation démarre lorsque 85 à 90 % de la caséine κest hydrolysée et elle atteint sa vitesse maximale lorsque la totalité de la caséine κ est hydrolysée.

Des liaisons électrostatiques et des liaisons hydrophobes participent à la formation du gel. Le calcium ionique et le phosphate de calcium colloïdal jouent aussi un rôle déterminant dans le phénomène.

III.4.3 .l'égouttage

Cette étape dû entre 24 et 36 heures, elle appelée encore (ressuyage). Elle permet d'éliminer le petit-lait encore présent et de fixer la teneur en eau du fromage. Cette opération se déroule à une température de 18 à 20C°, une température trop basse nuit à bon égouttage, et trop élevée fournit un fromage trop sec **(Fournier, 2007).**

L'égouttage est le résultat de deux phénomènes physiques différents **(FAO, 1995)** :

- Un phénomène actif, la synérèse, qui est dû à la contraction du gel ; il particulièrement important dans les coagulums présure.
- Un phénomène passif, résultant de l'aptitude du coagulum à laisser s'écouler le lactosérum occlus cette exsudation spontanée du sérum, liée à la perméabilité du coagulum, est une des caractéristiques des gels lactique.

III.4.4. Salage

Le salage peut s'effectuer selon deux techniques:

- salage à sec par saupoudrage superficiel, par frottage ou par incorporation dans la masse du caillé (cantal, cheddar)
- salage en saumure par immersion dans une solution saturée en NaCl.

L'incorporation du chlorure de sodium dans le fromage a pour objectifs :

- d'assurer un complément d'égouttage ;
- de contribuer éventuellement à la formation de la croute;
- de régler l'activité de l'eau (aw) du fromage qui oriente et freinte les développements microbiens et les actions enzymatiques au cours de l'affinage;
- d'accroître le potentiel organoleptique fromage **(Mahaut *et al*., 2003).**

III.4.5. Affinage

L'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé, c'est un processus biochimique complexe pour plusieurs raisons :

- ❖ d'une part, la matrice issue de la coagulation et de l'égouttage du lait présente une très grande hétérogénéité physicochimique.
- ❖ d'autre part, les enzymes intervenant dans l'affinage ont plusieurs origines **(Jeantet, 2007).**

• Les enzymes naturelles du lait : deux sont plus particulièrement importants à considérer, la lipase et la plasmine.

• Les enzymes coagulantes : les protéases utilisées pour la coagulation du lait contribuent de manière efficace à l'affinage **(Ramet, 1985).** La présure a une double activité, l'une très spécifique sur la caséine κ, l'autre de protéolyse générale **(Choisy *et al.*, 1997).**

• Les enzymes microbiennes : les microorganismes interviennent au cours de l'affinage par action de leur enzyme extracellulaire et intracellulaire **(Choisy, 1997 ; Gripon *et al.*, 1993).**

III.5.Classification des fromages et appellations

Selon **Kosikowski (1985**), il existe environ 2000 variétés de fromages et approximativement 500 d'entre eux sont regroupés par la Fédération Internationale du Lait (FIL ou IDF). La classification des fromages est d'autant plus compliquée à établir que les caractères sur lesquels pourrait se fonder une classification se confondent**.voir (Tableau02**)En général, les principaux critères de classification prennent en considération les points suivants **(Mietton et *al.*, 2004)** :

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

Tableau 02 : classification des fromages

Type de fromage	**Description**	**Références**
Fromages à pâte fraiche	Fromages peu égouttés qui n'ont pas été affines, il y'a juste coagulation des protéines du lait sous l'effet des ferments lactique (acidification).	**(Chamba et Irlinger, 2004)**
Fromages à pâte ferme	Constitués d'une pâte compacte, renfermant un peu moins d'eau que les fromages frais, mais contenant plus de sels minéraux dont les sels de calcium notamment. Dans cette catégorie, on distingue : les fromages à pâte ferme non cuite (Edam, Saint-Paulin, etc.) les fromages à pâte ferme cuite (Gruyère, Comté, etc.)	**(Parente et Cogan, 2004)** **(Yıldız, 2010)**
Fromages à pâte Molle	Fromages ayant subi un affinage relativement prolongé (protéolyse et lipolyse intenses par la flore de surface) après une fermentation lactique (ex. Camembert).	**(Branger, 2012)** **(Yıldız, 2010)**
Fromages à pâte Persillée	Fromages affinés, à moisissures interne (ex. Roquefort). Il y'a développement interne de *P. roqueforti* grâce à l'action de *leuconostoc* et des *levures* qui produisent une ouverture et une petite quantite d'éthanol	**(Settanni et Moschetti, 2010)**
Fromages Fondus	Constitues d'un mélange de fromage(s), de beurre, de crème et de lait, pasteurisé (95°C) ou stérilisé (125°C). Appelés aussi fromages remaniés, ils sont de nombreux types dont certains sont obtenus après récupération des fragments de fromages à pâte ferme tel que le Gruyère et qui présentent certains défauts. En réalité, il s'agit plus d'une dissolution suivie d'une dispersion de protéines dans l'eau que d'une fonte qui, correspond au sens physico-chimique du terme, à la désintégration d'une structure solide cristalline par l'apport d'énergie thermique ou l'exercice d'une pression.	**(Boutonnier, 2012)**

Matériels
&
Méthodes

Matériels biologiques

I. Origine de la souche

La souche identifiée comme *Bacillus amyloliquefaciens* est une souche locale isolée à partir du sol à proximité de la laiterie fromagerie Boudouaou par l'équipe de recherche de département de technologie alimentaire de l'université de Boumerdes.

Le choix de cette souche repose essentiellement sur son aptitude à produire les coagulases. Elle est conservée à 4°C sur gélose inclinée .Un repiquagetrimestriel est nécessaire afin de garder la vitalité de la souche.

Le milieu de culture utilisée est de type solide (fermentation en surface), dans le but d'optimiser une meilleure culture donnant une meilleure production d'enzyme, nous avons utilisés le son de blé comme substrat de fermentation.

I.1 .Obtention de l'extrait coagulant de *Bacillus amyloliquefaciens*

I . 1.1.Revivification de la souche *Bacillusamyloliquefaciens*

La souche conservée à 4 °C sur un milieu gélosé incliné a été repiquée dans des tubes à essais contenant un bouillon nutritif, ces derniers sont incubés à 30°C pendent 24h.

La culture bactérienne est ensemencée sur des boites de gélose nutritive est incuber à 30°C pendant 24h**(Voir figure 05).**

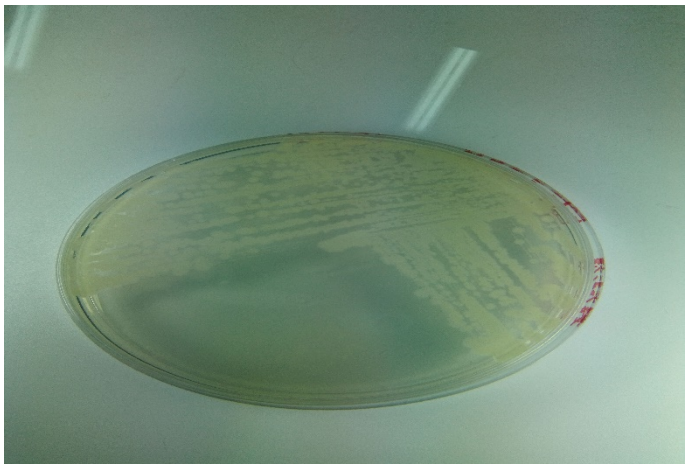


Figure 05: la revivification de souche *bacillusamyloliquefaciens.*

II.2.Préparation de l'inoculum

A l'aide d'une ance de platine stérile on gratte légèrement la surface de la gélosenutritive (GN) de façon à obtenir 4 à 5 colonie ; ensuite ces colonies ont été submergé dans une solution salé stérile (eau physiologique) 5 ml dans un tube à essai, ce dernier est agité à l'aide d'un vortex.

Après l'agitation la suspension est ajustée au standard MC Ferland 5 à l'aide d'un spectrophotomètre ce qui correspond, à une densité optique (DO) de 0.9 à une longueur d'onde de 600 nm. Ce tube a été considérer comme un standard de turbidité pour comparer la turbidité de la suspension bactérienne ; en examinant les tubes sur un fond blanc **(Voir tableau 03).**

Tableau 03 : Absorbance des différents Mc Farland Standard à 600 nm.

McFarland Standard	0.5	1	2	3	4	5
Approx.cell density (1X10^8 CFU/mL)	1.5	3	6	9	12	15
Absorbance*	0.08-0.1	0.257	0.451	0.582	0.669	0.9

I.1.3. Préparation et inoculation de milieu de culture

Pour la fermentation, le milieu de culture choisi est un milieu solide dont la préparation est comme suit :

Le son de blé est distribué dans des erlenmeyers à 250 ml à raison 30g supplémenté de 2,5 g de lait écrémé (qui contient le lactose pour l'énergie et la caséine comme inducteur de la production d'enzyme) dans 60ml de sulfate d'ammonium (NH4)2SO4 à 0,1% (poids/vol).

Les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé enveloppé dans un filet de gaz et coiffés de papier aluminium (qui supporte une bonne étanchéité et supporte les hautes températures) ils sont alors stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn, puis on introduit dans chaque erlenmeyer 5 ml de l'inoculum. L'incubation a lieu à 32°C pendant 24 heures **(Voir figure 06).**



Figure 06: Préparation de milieu de culture.

I. 1.4.Extraction de la protéase extracellulaire

L'extraction de l'enzyme est réalisée par l'addition de 50 ml de l'eau distillée stérile dans chaque erlenmeyer.

Après agitation mécanique à température ambiante, le contenu est filtré à travers un filet de gaz puis centrifugé à 4000 tours pendant 30 min à 4 °C dans une centrifugeuse à froid**(Rao et Mathur, 1976).**Le surnageant récupéré constitue l'extrait enzymatique brut**(voir figure 07).**



Figure 07 : Récupération de surnagent.

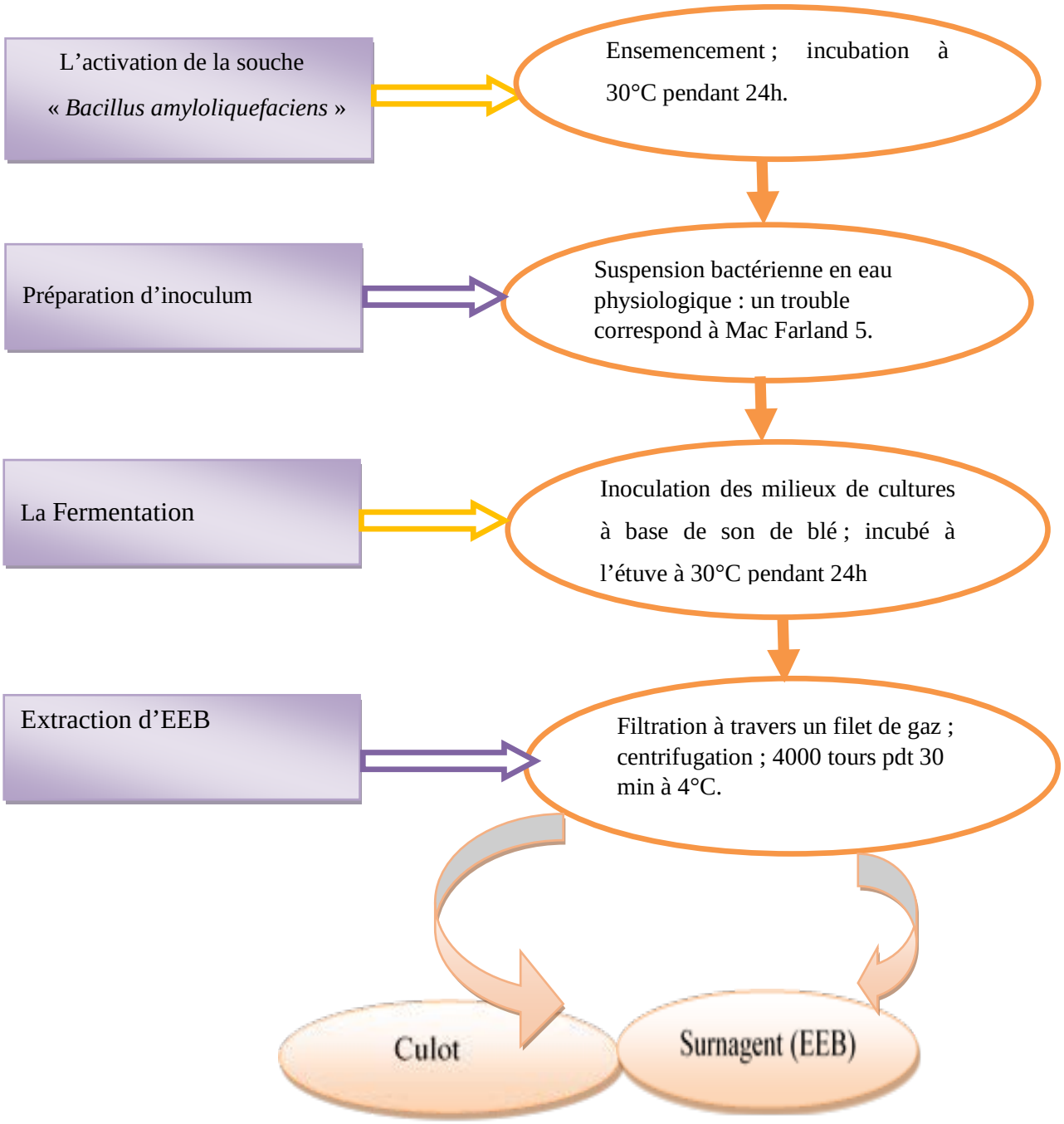


Figure 08: Protocole d'obtention de l'extrait enzymatique brut produit par la souche *Bacillus amyloliquefaciens.*

II. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

II.1.Mesure des activités enzymatiques

II.1.1.Mesure de l'activité coagulante (AC)

-L'activité coagulante est déterminée selon deux méthodes :

a- la méthode de Berridge (1945) modifiée par Collin*et al*. (1977)

Cette méthode permet d'exprimer l'activité de l'extrait enzymatique en unité de présure (Up), qui correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour coaguler 10 ml de substrat standard en 100 secondes à 35°C.

12 g de poudre de lait écrémé « lowheat » standard de Berridge sont dissout dans 100 ml d'une solution de $CaCl_2$ à 0,01M sous agitation magnétique pendant 30minutes ; le pH est d'environ 6,5.Le substrat ainsi reconstitué est reparti dans des tubes à essais à raison de 10 ml par tube. Les tubes sont placés dans un bain marie à 35°C pendant 30 min.

1ml de l'extrait enzymatique est alors ajouté au substrat. Le tube est agité et on note à l'aide d'un chronomètre, l'apparition de la première floculation sur la paroi du tube. L'activité coagulante est exprimée en unité présure (Up.).**(Voir annexe 01)**

L'activité coagulante est calculée selon l'expression suivante :

$$\mathbf{Up = 10V/v.t}$$

Avec :

V : volume de lait (substrat de Berridge) ajusté à pH 6.4 et porté à 35°C (10ml).

v : volume de l'extrait enzymatique (1ml).

t : temps de coagulation en secondes.

b- la méthode de Soxhlet

L'activité coagulante peut être également exprimée en ''force coagulante'', exprimée en unité Soxhlet et représente le nombre de volumes de lait frais coagulés par un volume de présure en 40 minutes à 35 °C.

Une unité internationale UI= 400 SU (unité soxhlet) correspondant à la quantité d'enzymes qui coagulent les 10ml de lait en 1 minute.

$$F = 2400.V/T.\ v$$

Avec :

F : force coagulante.

V : volume de lait (substrat de Berridge) ajusté à pH 6.4 et porté à 35°C (10ml).

t : temps de coagulation du lait en secondes.

v : volume de l'extrait enzymatique (1ml).

Le nombre '2400' représente le temps standard du test (40 min) en secondes.

Il existe une relation **UP=F x 0,00457(Alais, 1984).**

II.1.2.Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée par la méthode décrite par **Silva *et al* et Shieh*et al***

Le mélange réactionnel est composé de 0,4 ml de 0,5% de caséine (Sigma) (p /v) dans l'eau distillée, 0,4 ml de 0,2 mol / L de tampon acétate à pH 5,5, et 0,2 ml de l'enzyme brute.

La réaction a eu lieu dans un bain à 35 °C et au bout de 30 min, la réaction a été stoppée en ajoutant 1 ml d'acide trichloracétique à 10% (TCA).2 ml du filtrat ci-dessus a été ajouté du NaOH à 5 ml (0,28 N) et une solution de 1,5 ml de réactif de phénol (solution de phénol de Folin-Ciocalteu: eau = 1 : 2). Après que le mélange a été maintenu à 35 ◦C pendant 15 minutes, la densité optique (DO) à 660 nm a été mesurée. L'activité protéolytique a été exprimée en termes d'unités (PA) correspondant à DO 660nm.

II.2.Détermination de l'indice AC/AP

Selon **Abdelfattah *et al.*, 1974 et Abderrahmane *et al.*, 1190,** le rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique (AC/AP), pour les préparations enzymatiques, représente un indice d'appréciation de la qualité des présures de remplacement par rapport à la présure de référence. Sa mesure permet de déterminer l'aptitude d'une préparation enzymatique à coaguler le lait au même titre que la présure.

II.3.Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales est déterminé par la méthode de Lowry **(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. Les espèces réduites absorbent la lumière à 750 nm. Le dosage des protéines s'effectue à cette longueur d'onde en utilisant une spectrophotométrie visible. La concentration en protéines de l'échantillon analysé est déterminée en se référant par projection à une courbe d'étalonnage DO=f (c) où l'albumine sérique bovine commercial (BSA) est utilisée comme protéine étalon **(Boudjnah, 2012). (Voir annexe 02).**

II.4.Détermination des conditions optimales de l'activité coagulante

La caractérisation d'extrait enzymatique brut consiste à la détermination des conditions optimales de l'activité coagulante en fonction de certains facteurs.

La mesure de l'activité coagulante est déterminée en mesurant le temps de coagulation selon la méthode de **(Berridge, 1945)** modifiée par **(collin*et al*, 1977).**

II.4.1.Détermination de la température optimale d'activité

La température optimale de coagulation du lait a été déterminée en portant le lait à différentes températures de 30°C à 85 °C avec un intervalle de 5°C.

II.4.2.Influence du pH de lait

L'influence de pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique a été déterminée en faisant varier le pH du lait de 5,0 à 8 avec un intervalle de 0,2en utilisant du HCl 0,1N et du NaOH 0.1N.

II.4.3.Détermination de la concentration optimale de $CaCl_2$

L'influence de la concentration en $CaCl_2$sur l'activité coagulante a été déterminée en faisant varier la concentration du lait en ions $CaCl_2$ de 0.01 à 0,08M avec un intervalle de 0,01M.

II.4.4.Influence de la concentration en extrait enzymatique

Les activités coagulantes ont été déterminées en faisant varier la concentration en protéines de l'extrait enzymatique de 0,02 à 0.175 mg / ml avec intervalle de 0,02 mg/ml.

II.4.5.Etude de la stabilité thermique de l'extrait enzymatique

La stabilité thermique de l'extrait a été étudiée en mesurant son activité coagulante résiduelle après maintien de l'extrait enzymatique à des températures variables de 30°C à 80°C pendant 15min. L'activité coagulante résiduelle est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité initiale et déterminée selon les conditions standards de mesure.

III. Analyse physico-chimiques de lait

Le contrôle physico–chimique permet d'évaluer la stabilité et la consistance du produit en ce qui concerne ses caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques.

Les analyses physicochimiques :(Matière grasse, Densité, Protéine, Température,conductivité, point de congélation, pH)du lait ont été réalisées à l'aide d'un appareil

EKOMILK.

III.1.Dosage de l'acidité Dornic

Remplir la burette de la solution de NaOH N/9 et la fixer au statif. Régler le niveau du liquide àzéro. À l'aide d'une pipette de 10 ml, prélever 10 ml de lait et transférer dans la fiole conique de100 ml. Ajouter 5 gouttes de solution de phénolphtaléine et titrer jusqu'à apparition d'une couleurrose persistante. Noter le volume de solution titrant utilisé en millilitres **(Guiraud, 1998 ; Moulay *et al.*, 2006).** L'acidité produite est calculée comme suite :

Acidité = V

V $_{NaOH}$= volume de la soude coulé.

L'acidité est exprimée en degré Dornic ou 1°D = 0.1 g/l d'acide lactique.

NB : Le degré dornic est une unité de mesure d'acidité de lait du nom de Mr. Dornic ancien directeurde l'école d'industrie laitière. 1◦D correspond à 0.1g d'acide lactique par litre de lait. Un lait est considéré comme frais lorsqu'il a une valeur inférieure ou égale à 18◦D.

III.2.Détermination de l'extrait sec total

D'après **Audigier*et al.*,(1980),** la détermination de la matière sèche repose sur l'évaporation d'un volume du lait que l'on pèse son résidu par la suite**.**

- Peser la capsule vide et sèche.
- Verser 10ml du lait dans cette dernière.
- Porter la capsule à l'ébullition jusqu'à l'évaporation totale de l'eau.
- Après l'étuvage (103°C pendant 3heurs) et le refroidissement dans un dessiccateur, peser la capsule pour déterminer le poids de l'échantillon après dessiccation.

La teneur de l'EST est exprimée en % par la formule suivante :

$$EST = \frac{p_1 - p}{v} x 100$$

Avec :

***EST* :** L'extrait sec total du lait en g/l.

***P* :** Poids de la capsule vide en g.

***V* :** Volume de prise d'essai en ml.

***P1* :** Poids de la capsule et le résidu après la dessiccation en gramm.

III.3.Détermination de l'extrait sec dégraissé (ESD)

C'est l'extrait sec non gras, il est calculé par la formule suivante :

ESD=EST-MG

EST : Extrait sec totales (g /L).

MG : Matière grasse (g /L).

IV. Essai de fabrication du fromage à pâte pressée cuite par l'utilisation de l'EEB

IV.1. Étapes de fabrication du fromage

L'essai de fabrication de fromage a pour objectif principal l'étude des aptitudes à la coagulation du lait de l'enzyme extraite en comparaison avec la présure commerciale.

Ces essais ont été réalisés au niveau du laboratoire de la faculté des sciences du département SNV.

Étant donné, l'activité fortement protéolytique de l'extrait enzymatique de *Bacillus amylolequifaciens*, nous avons choisi d'élaborer un fromage de type pâte pressée cuite, afin d'inhiber cette activité juste après coagulation, et limiter ainsi les pertes en rendement fromager.

Nous avons élaboré deux types de fromage à pâte pressée cuite dans les même conditions se différenciant par :

- **Type 1 :** coagulation par EEB.
- **Type 2 :** coagulation par présure.

Le volume de lait total utilisé est de 10 L issu de la ferme ITELV celui-ci est divisé en bacs de 2 litres de contenance. Le procédé de fabrication utilisé a été proposé par **Harbutt, (2010)** pour les fromages à pâte pressée cuite.

- ✓ **Préparation du lait**

1. Pasteurisation

C'est un traitement thermique du lait il permet l'élimination des germes pathogènes du laitse fait à une température de80°C pendant 20 secondes pour ne pas altérer les propriétésorganoleptiques du lait **(Majdu, 2009).**

Après refroidissement du lait à 42°C, on ajoute 2.5 g de $CaCl_2$**(Voir figure 09).**



Figure 09 : la pasteurisation de lait.

2. Ensemencement du lait traité

La maturation du lait est réalisée par ajout de ferments lactiques mésophiles**.** Lesferments ou levains lactiques sont des cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques qui se multiplient dans le lait et dans les fromages, assurent deux fonctionsessentielles :

- Abaisser le pH du milieu en transformant le lactose en acide lactique.
- Contribuer aux caractères organoleptiques des fromages en libérant lessystèmes enzymatiques.

✓ **Emprésurage**

Correspond au moment où l'on ajoute la présure en vue de provoquer sa coagulation. Cette dernière se traduit par une floculation des micelles de caséines qui s'unissent pourformer un gel accompagné d'une liquide appelée lactosérum.

Cette étape est réalisée quand le pH est d'environ de 6.4 et à la température de 42°C pour la présure et à 55°C pour l'EEB.

La dose des différents extraits coagulant additionnés pour chaque deux litres de lait est calculée préalablement à partir de la force coagulante (F) de chacun :

- Force de présure : 3 à 4 g /100 ml ⟶ dose 0.06 g/2L.
- Force EEB 1/100 ⟶ 2 ml /2L.

✓ **D'écaillage et délactosage**

Cette étape consiste a découpé le caillé en grain de petites tailles sous forme de grain de mais, l'outil utilisé lors de cette étape est le tranche – caillé **.**Ensuit délactosage " lavage du caillé " l'opération qui consiste à remplacer une partie du sérum par de l'eau pour abaisser la richesse du caillé en lactose pour éviter une sur acidification (réduire l'acidité par l'ajout de l'eau) **(Majdi, 2009) (Voir figure 10 et 11).**



Figure 10 :D'écaillage et délactosage.



Figure 11 : lavage du caillé.

✓ **La cuisson du caillé**

Le caillé subit un chauffage après son lavage, pour le caillé à base de présure la température de cuisson est de 53°C pendant 45 min quant au caillé à base de l'EEB sa température de cuisson est de 60°C pendant 45min, dont une partie de la flore lactique est détruite.

✓ **Pré pressage, moulage, pressage**

Après la cuisson du caillé, il est pressé à l'aide d'une toile pour permettre un égouttage sans qu'il y ait une perte de caillé, puis il est mis dans des moules troués, munis d'une toile. Enfin les moules sont pressés à l'aide d'une plaquette massive pendant 4 heures, afin d'augmenter l'extrait sec et de favoriser l'expulsion du sérum résiduel et donner une bonne texture au fromage. Le pressage consiste à :

- Eliminer forcement le lactosérum.
- Donner au fromage sa forme définitif en utilisant des moules en plastique alimentaire **(Majdi, 2009). (Voir figure 12 et 13)**



Figure 12 : Egouttage.



Figure 13 : lemoulage.

✓ **Le salage**

On peut saler le fromage soit par pulvérisation en surface de sel fin (à pâte molle) soit par immersion dans un bain de saumure (=eau +sel) **(Fredot, 2005).**

Pour notre essai, les boules de fromage sont démoulées et immergées dans un bain de saumure (20 % de sel) entre 14 et 18°C pendant 48h.

Le sel joue un triple rôle :

- ❖ Il complète l'égouttage et contribuera ainsi à la formation de la croûte.
- ❖ Il règle l'activité de l'eau et ainsi favorise ou freine le développement des microorganismes tout en régulant les activités enzymatique.
- ❖ Il révèle la saveur propre du fromage en influençant le goût et en renforçant les arômes**.(Voir figure 14).**



Figure 14 : le salage.

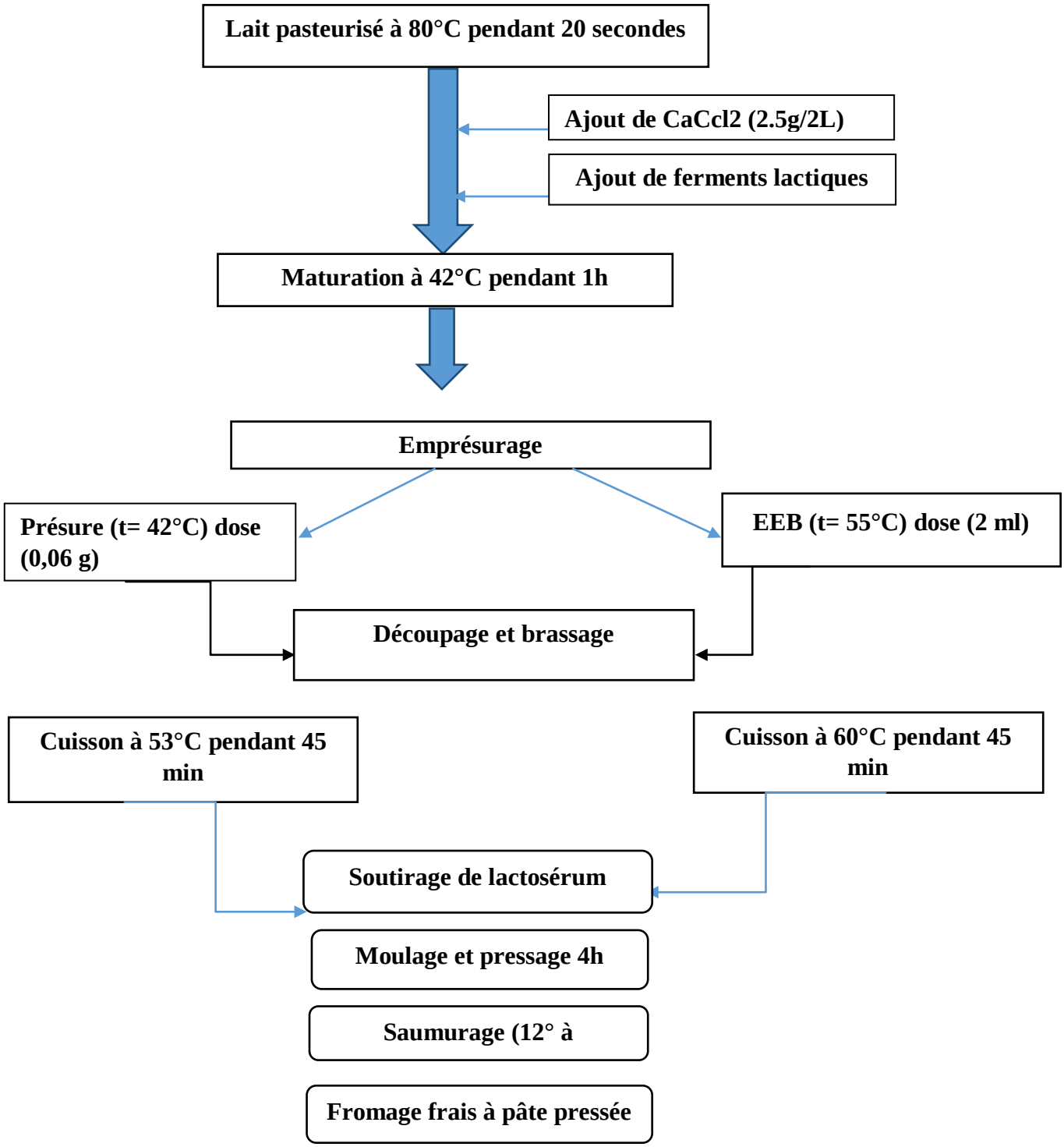


Figure 15 : Résumé des étapes de fabrication du fromage à pâte cuite pressée.

IV.2.Analyses physico-chimique du fromage

Cette analyse a comporté la mesure du pH, de l'acidité titrable, la détermination de la composition chimique des échantillons du fromage préparé à savoir l'extrait sec total et la matière grasse.

- ✓ **Le pH**

La mesure de pH du fromage réalisé est effectuée par l'emploi d'un pH-mètre, et cela par l'immersion de son électrode dans la croûte de l'échantillon de fromage. La valeur du pH est directement lue sur l'appareil.

- ✓ **Détermination de l'acidité**

2g de fromage sont ajoutés à 20 ml d'eau distillée, 5 à 6 gouttes de phénolphtaléine, préparée à 1% dans de l'éthanol absolu, sont ajoutées puis titrées par une solution d'hydroxyde de sodium, NaOH à0, 1 N jusqu'au virage de la couleur vers le rose clair

(NF V04-206, 1969).

- ➢ Expression des résultats :

$$D° = (N.V .100/20)$$

Avec :

N : normalité de NaOH (mol/l).

V : volume de NaOH titré (ml).

100 : masse molaire de l'acide lactique (g/mol).

20 : la quantité d'eau distille ajoutée à 2g de fromage frais (ml).

- ✓ **Détermination de la teneur en matière grasse**

La teneur en matière grasse du fromage est déterminée par l'utilisation de la méthode acido-Butyrométrique de Van Gulik **(AFNOR, 1993**) **(Voir annexe03).** Le principe de cette méthoderepose sur la dissolution de la matière protéique par acide sulfurique à chaud. La séparation de la matière grasse est obtenue par centrifugation dans un butyromètre de Van Gulik. Cette séparation est favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool iso- amylique.

- Expression des résultats

La teneur en matière grasse exprimé en gramme pour 100g de fromage est donnée par la formule suivante :

$$MG\ (\%) = B\text{-}A$$

Avec :

A : la lecture faite à l'extrémité inférieure de la colonne de MG.

B : la lecture faite à l'extrémité supérieure de la colonne de MG.

- ✓ **Détermination de l'extrait sec total**

L'extrait sec total a été déterminé par dessiccation de 5g d'échantillon à l'étuve à la température de 102±2°C. Cette teneur, exprimée en g de matière sèche pour 100g de fromage, est calculée selon la formule suivante.

$$EST\ (\%) = (M\text{-}m).\ 100/E$$

Avec :

m : Poids d'une capsule après sa sortie de l'étuve.

M : Poids d'une capsule avec 5g de l'échantillon émietté avant dessiccation àl'étuve.

E : la masse en gramme de la prise d'échantillon (5g).

- ✓ **Détermination de l'extrait sec dégraissé (ESD)**

L'extrait sec dégraissé exprime la différence entre l'extrait sec total du produit et sa matière grasse. Il est donc déterminé par la formule suivante :

$$ESD(\%) = (EST - MG) \times 100$$

- ✓ **Détermination du rendement fromager**

Le rendement fromager ou le rendement de la transformation du lait en fromage est l'expression mathématique de la quantité de fromage obtenu à partir d'une quantité donnée de lait **Vandewegh, (1997).**Il est déterminé par la formule suivante :

$$Rdt = 10 \times ESD \times Pds/V$$

Avec :

Rdt : Rendement fromager.

ESD : Extrait sec dégraissé.

Pds : Poids.

V : Volume du lait mis en œuvre.

IV.3.analyse microbiologique de fromage

Objectif

L'objectif des analyses microbiologiques est de rechercher ou de quantifier un certain nombre de micro-organismes, indicateurs d'un ou de plusieurs problèmes rencontrés lors du procédé de Fabrication ou susceptibles de présenter un risque pour la santé humaine lors de la mise sur le marché**.**

IV .3.1.L'échantillonnage

Introduire et diluer aseptiquement 25 grammes de produit à Analyser « fromage» dans un bocal stérile préalablement taré ou dans un sachet stérile de type « Stomacker » contenant au préalable 225 ml de diluant EPT (Eau Peptonée Tamponnée).

Cette suspension constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond donc aux dilutions 1/10 ou 10^{-1}.

IV .3.2. Préparation des dilutions décimales

- Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette en verre graduée et stérile 1ml de la DM, dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant : cette dilution sera alors au 1/100 ou 10-2.
- Introduire par la suite 1ml de la dilution dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant : cette dilution est sera alors au 1/100 ou 10-3.
- Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette en verre graduée et stérile, 1 ml de la dilution 10-3 dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant : cette dilution est alors au 1/1000 ou 10-4.

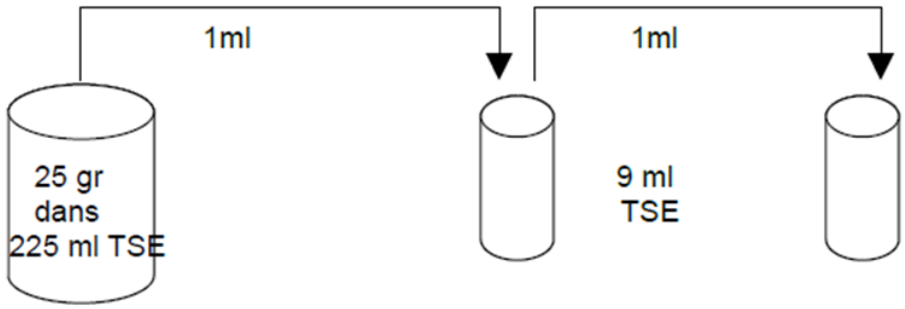


Figure16: Schéma représente la préparation des dilutions.

IV .3.4. Les germes recherchés pour cette denrée et leurs dénombrements

- Les staphylococcus aureus **(Voir annexe 04).**
- clostridium **(Voir annexe 05).**
- les salmonelles **(Voir annexe 06).**
- Les coliformes totaux **(Voir annexe 07).**

La composition des milieux de culture **(Voir annexe 08)**.

IV.4.Analyse sensorielle du fromage

L'objectif de cette analyse consiste à décrire les caractéristiques sensorielles du fromage fabriqué soit la texture, la couleur, goût du fromage provoquant des réactions plus ou moins vives d'acceptation ou de rejet.

Le test de dégustation est mené sur deux (02) échantillons du fromage fabriqué (type de pâte pressée cuite) :

- ✓ Le premier fabriqué avec la présure commerciale.
- ✓ Le deuxième fabriqué à partir de l'extrait enzymatique brut de *Bacillus amyloliquefaciens.*

L'épreuve consiste à présenter d'une manière anonyme l'ensemble des différents échantillons des fromages fabriqués à des personnes (8 à 10) qui devront les noter et ainsi exprimer leur préférence.

Une fiche de dégustation**(Voir annexe 09),** préparée suivant les objectifs du test de dégustation, comportant les caractères organoleptiques les plus importants dans l'appréciation de la qualité, a été mise à la disposition de chaque dégustateur. Chaque critère comporte une échelle de notation (score) commune de 0 à 6 :

- ✓ **0** = très mauvais.
- ✓ **6** = très bon.
- ✓ **3**= limite d'acceptabilité.

La différence statistique entre les lots est évaluée à l'aide du Quick Rank Test de KRAMER **(Kramer, 1960)** basé sur la somme des rangs**(voir annexe 10).**Le seuil de probabilité est de 5% (p = 0.05).

RESULTATS
&
DISCUSSIONS

I. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut (EEB)

I.1. Caractère apparent de l'extrait enzymatique

L'extrait enzymatique brut (EEB) obtenu est de couleur marron foncé.



Figure 17 : Caractère apparent de l'extrait enzymatique.

I.2. Activité coagulante de l'EEB

Après l'extraction, l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut issue de *Bacillus amylolequefaciens* a été déterminée par les méthodes de Soxhlet et de Berridge. Les résultats obtenus sont rapportés dans le **tableau 04.**

Tableau 04 : Activité coagulante de l'extrait enzymatique brut.

	Activité coagulante (Up)	**Force coagulante (Us)**
EEB de *Bacillus amyloliquefaciens*	0.41 UP/ml	100

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique issue de *Bacillus amyloliquefaciens* est exprimée en force coagulant selon le principe de Soxhlet (décrit précédemment).

La force coagulante de notre extrait brute est de 1/100 ce qui implique qu'un ml d'extrait enzymatique coagule 100ml de substrat de Berridge .De même notre activité coagulante est de l'ordre de 0.41 Up**. (Voir tableau 05).**

Tableau 05 : Comparaison de l'AC de l'EEB aux autres AC des coagulases.

Préparation enzymatique	**Unité présure (UP)/ml**	**Force coagulante (F) US**	**Références**
B. amylolique faciens	0.41	100	
ECD2	0,155	34,44	Cahiers Agricultures vol. 14, n° 5, septembre-octobre 2005.
PBC	0,149	33,11	Cahiers Agricultures vol. 14, n° 5, septembre-octobre 2005
Aspergillus Niger	0.373	82.88	Bensmail souhila 2012
rhizomes de gingembre	5,88	1411.76	Yahia Mohammed zhor,yakhou Naima 2015
Mucor pusillus	0.34	1200	Melle Nabila belhamiche 2005
Pepsine de poulet*	15,08 ± 0,86	4559 ± 330	ADOUI Faiza.2005
F9	1.212	29.09	REKIK chaynez HADDADI hadjer. 2017
Présure de poulet	323,62 ± 44,56	70815 ± 1865	ADOUI Faiza.2005
D3	13.33	3200	ADOUI Faiza.2005
D4	2.27	545.45	Melle hamrani lamia. 2008

ECD2 : extrait coagulant gastrique de dromadaire âgé de 2 ans ; **PBC** : présure bovine commerciale**.**

*extrait enzymatique issu de pepsine de poulet issu de 100 g de pro ventricules par macération durant 3h à 25°C

F9 : *Bacillus subtilis* **; D3** : EEB de poulet ; D4 : EEB de limon

Cette valeur est bien comparée aux activités de présure de poulet de référence et aux données bibliographiques relatives aux autres origines d'extraits enzymatiques, la force coagulante obtenue est trop faible **(voir tableau05).** Cependant cette comparaison n'est pas très significative étant donné que les préparations commerciales sont à l'état pur contrairement à l'extrait coagulant de notre souche *Bacillus amylolequifaciens* qui se trouve à l'état brut.

Cette différence est due au milieu de culture ou de la fermentation. Ainsi, à ce stade expérimental, l'activité coagulante de l'extrait brut obtenue est relative puisque elle dépend de plusieurs facteurs telles que la présence de diverses substances indésirables, la nature des solvants utilisés, leurs pH, leurs forces ioniques…etc.

I.3. Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique

La teneur des fractions protéique isolées est estimée par dosage spectrométrique en utilisant la méthode de **(Lowry ,1951) (Voir annexe 01)** est de l'ordre 175 µg/ml. (0.175mg/ml).Les concentrations en protéines des extraits enzymatiques bruts sont déterminées par référence à un courbe étalon de BSA**. (Voir figure 18).**

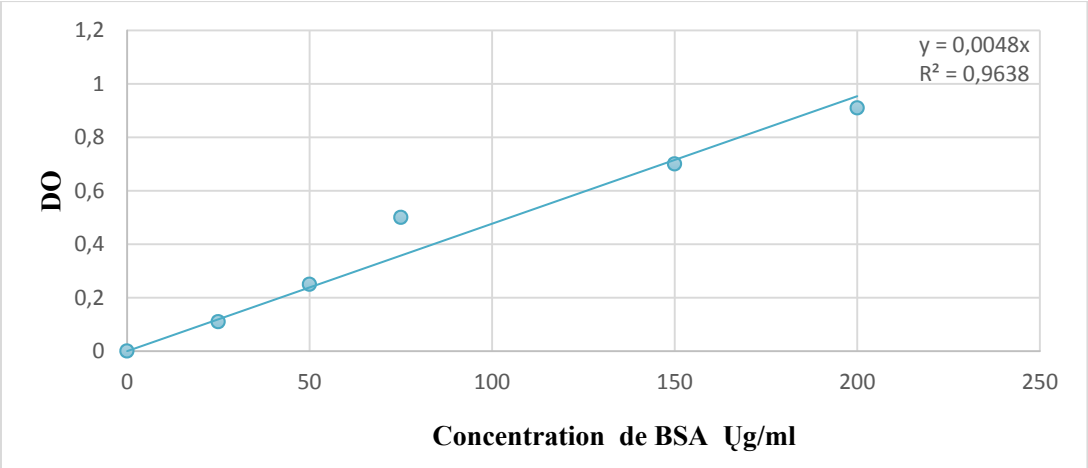


Figure 18 : Courbe étalon de sérum d'albumine bovin (BSA).

L'extrait coagulant brut à une composition mixte comprend des protéines enzymatique et non enzymatique. Lorsqu'on compare notre résultat avec le taux de protéine d'Extraits brut pepsine de bovin qui est 23,68 **(mg/ml)** et de l'extrait enzymatique brut de gingembre qui est 77.5 **(mg/ml).**on remarque que notre extrait ayant une faible teneur en protéine.

I.4. Activité protéolytique

Le résultat de l'activité protéolytique est indiqué par le **tableau06**

Tableau 06 : comparaison d'activité protéolytique par d'autre souche microbienne et EEB de pepsine de bovin.

	activité protéolytique DO660	**Référence**
EEB de *Bacillus amyloliquefaciens*	0.522±0.001	
EEB de *Bacillus subtilis*	11.24±0.001	Isolement des souches bactériennes à partir du sol Productrices d'enzyme coagulant le lait (Caractérisation et purification de la protéase)
Extraits brut pepsine de bovin	0,68±0,07	Extraction, purification et caractérisation d'une enzyme protéolytique issue de caillettes de bovins adultes. Aptitudes technologiques des extraits

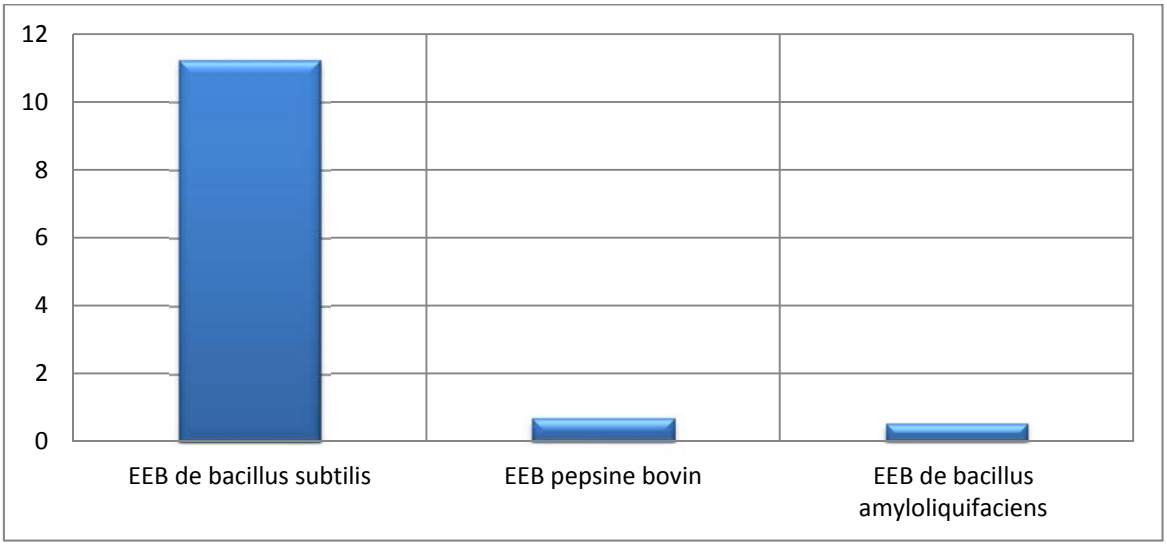


Figure 19 : comparaison de l'activité protéolytique d'EEB de *B. amyloliquefaciens.*

Dans notre étude, nous avons observé une forte activité protéolytique d'EEB est de l'ordre de **0.522**.On se basant sur nos résultats nous pouvons constater que l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut de *Bacillus amyloliquefaciens* est

largement inférieure à EEB de pepsine bovine et EEB de *Bacillus subtilis*. Ainsi, l'action de rupture de la liaison *Phe105-Met106* de la caséine K par les aspartyl protéases comme l'EEB est semblable à celle de la chymosine et les autres protéases d'origine fongique et bactériennes (**Sidrach et *al.*, 2005).**

Ce phénomène est généralement indésirable en technologie laitière car il est à l'origine du développement d'amertume retrouvé dans les produits fromagers**.**

Les enzymes d'origine bactériennes présentent une activité protéolytique trop élevée par comparaison à la présure dans les mêmes conditions de la coagulation de lait **(Alais1984 ; Mahon et Brown 1985).**

I.5. Détermination de rapport AC/AP

L'indice AC/AP de l'extrait enzymatique à l'état brut de notre souche *Bacillus amyloliquefaciens* est de l'ordre de **0.796**. Selon **(Abdelfattah *et al.*, 1974) et (Abderrahmane *et al.*, 1990),** le rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique (AC/AP), pour les préparations enzymatiques, représente un indice d'appréciation de la qualité des présures de remplacement par rapport à la présure de référence. Sa mesure permet de déterminer l'aptitude d'une préparation enzymatique à coaguler le lait au même titre que la présure.

I.6.Les conditions optimales de l'activité coagulante (voir annexe11)

I.6.1.Influence de la température sur l'activité coagulante

La détermination de la température optimale du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut (EEB) de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* a été étudiée à des températures allantes de 30°C à 85°C par un palier de 5°C.

Les résultats rapportés dans la **figure 20** indiquent que l'activité coagulante augmente avec l'élévation de la température pour atteindre son optimum au voisinage de 75°C (2.40± 0.36 Up/ml). Au-delà de 75°C on note une baisse rapide de l'activité coagulante, puis s'annule à 85°C (inhibition total de l'enzyme), cette température d'inhibition est similaire à celle obtenue avec la souche *Bacillus subtilis* LC33 **(Matoub, 2000)**.

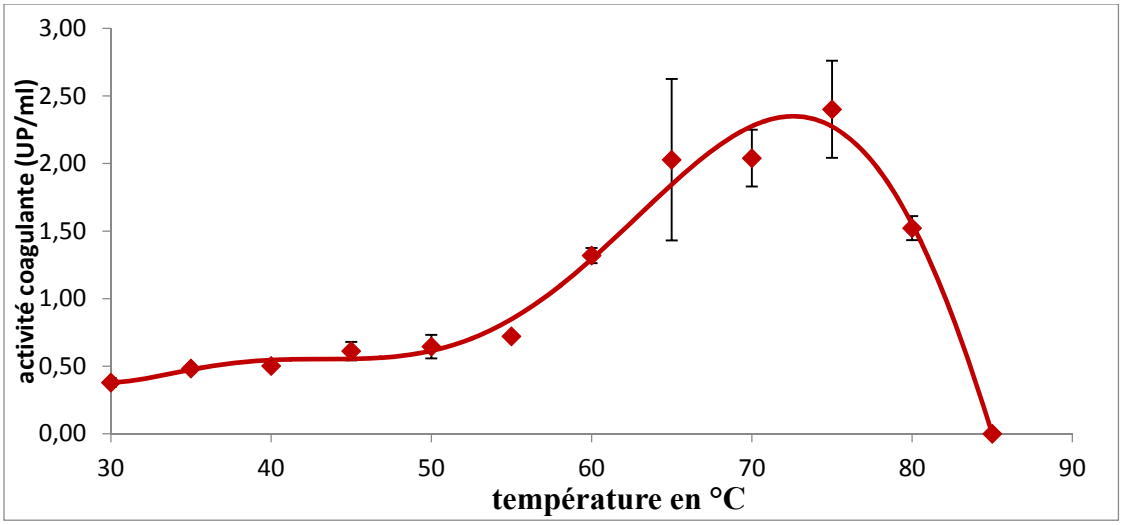


Figure 20 : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'EEB.

L'augmentation significative de la température diminue le temps d'agrégation et augmente la vitesse d'organisation du caillé mais réduit sa fermeté **(brulé et *al.*, 1997)**, ceci est observé sur un intervalle de 60°C à 70°C. Ce qui peut s'expliquer par une dénaturation partielle des protéines coagulantes de l'extrait lors de son adjonction à un lait chauffé à de hautes températures ou bien par la modification du lait par l'évaporation qui survient aux hautes températures (concentration du milieu) et à l'insolubilisation des sels, en particulier ceux de $CaCl_2$, ce qui compromet le bon déroulement de la coagulation **(Morsli, 1996)**.

La température optimale obtenue avec l'extrait enzymatique est identique à celle rapporté par la souche *Bacillus licheniformis* 5A5 **(Ahmed et Helmy, 2012)** et aussi proche de celle de *Bacillus subtilis* B1 (température optimale de 70°C), par **Ding et *al.*, (2011)** mais différente de celle obtenue par présure (42°C-45°C), par (**Mahaut *et al.*, 2000)**.

D'une manière générale, les enzymes d'origine microbienne se distinguent par des températures létales et d'activités optimales plus élevées. Cette propriété justifie l'emploi de ces enzymes dans la fabrication fromagère à base de laits pasteurisés où l'étape de refroidissement avant emprésurage ne serait plus nécessaire **(Nouani *et al.*, 2009)**

I.6.2. Influence du pH sur l'activité coagulante

L'effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut a été établi dans un intervalle des pH allant de 5.7 à 8.1 avec un pallier de 0.2. L'observation de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique n'a pu se faire qu'à partir d'un pH de 5.7, car en dessous de ce pH, le lait coagule avant l'addition de l'extrait enzymatique (coagulation acide).

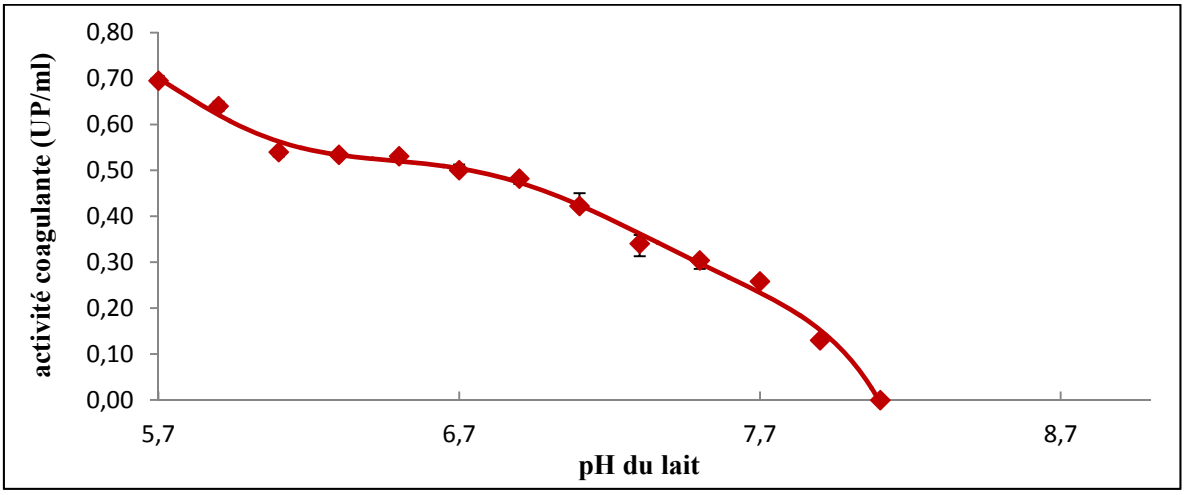


Figure 21 : effet du pH sur l'activité coagulante de l'EEB.

Comme le montre **la figure 21,** Le pH optimal d'hydrolyse de la caséine par l'EEB est de 5.7 avec une activité coagulante de 0.7±0.01 Up/ml. Au-delà de ce pH on observe une chute graduelle de l'activité coagulante, puis elle s'annule au pH de 8.1 (inhibition totale de l'EEB).

Nos résultats se rapprochent de ceux obtenus avec la présure et l'enzyme extraite à partir la souche *Bacillus amyloliquefaciens* D4.Selon **He *et al* (2011)**, l'activité coagulante optimale de l'enzyme obtenue à partir de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* D4 est à pH de 5.5, puis elle est inactivée à pH de 8. D'autre part, **Mahaut et *al.*, (2000)** rapportent que le pH de la présure est compris entre 5.3 et 6.3, avec un optimum d'action de 5.8. Elle est inactivée à pH 7.5 et elle est complètements dénaturée à pH 8.

L'abaissement du pH provoque la diminution du temps de coagulation **(Mahaut et *al.*, 2000)**. Ce qui favorisera l'augmentation de la vitesse de raffermissement, et par suite une diminution de temps de raffermissement, ce qui est dû à une plus grande disponibilité de ca^{2+} **(Mahaut et *al.*, 2000)**.

I.6.3. Influence de la concentration en $CaCl_2$

Glantz et *al.*, *(*2011) ont constaté que la concentration du calcium ionique dans le lait est corrélée avec les propriétés de sa gélification, où une concentration plus élevée en cet élément aboutit à des temps de gélification plus courts et une plus grande résistance et fermeté des gels.

Pour étudier l'influence du calcium sur l'activité coagulante de la protéase de *Bacillus amyloliquefaciens*, le calcium a été ajouté au lait sous forme de chlorures de calcium $CaCl_2$, tout en faisant varier la concentration de ce dernier de 10mM à 80mM.

Les résultats illustrés par la **figure 22** montrent que l'activité coagulante de la protéase croit avec la concentration en $CaCl_2$ jusqu'à atteindre une valeur optimale de l'ordre de 40mM, au-delà de cette valeur, l'activité coagulante diminue par un effet inhibiteur de l'ion calcium.

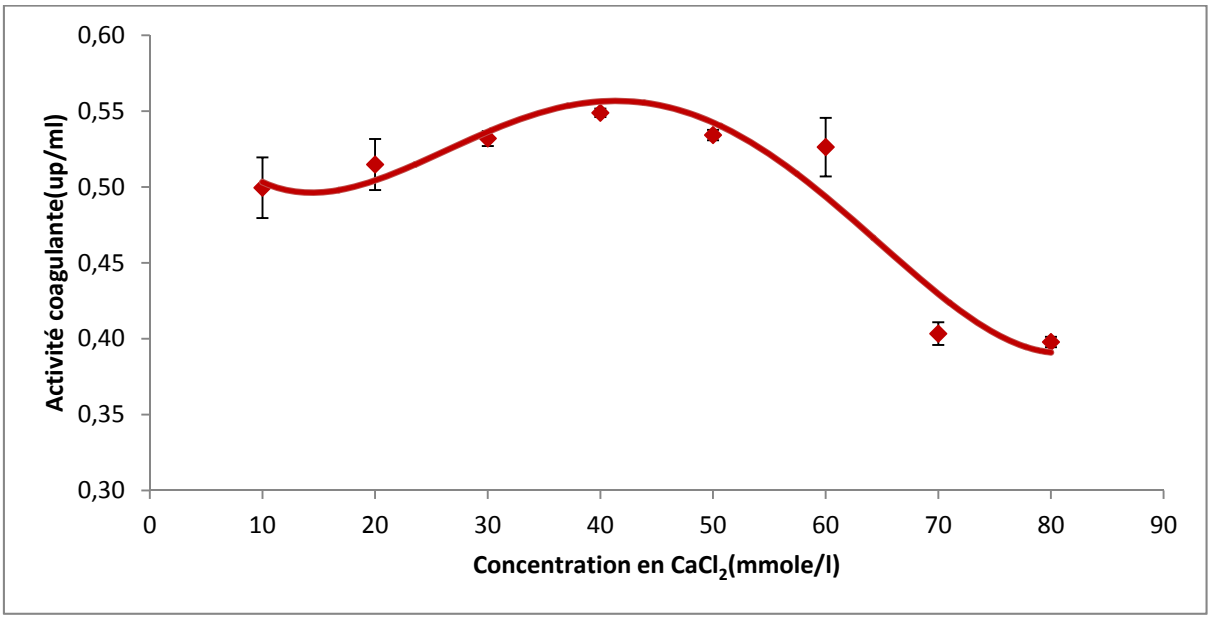


Figure 22 : Effet de la concentration en $CaCl_2$ du lait sur l'activité coagulante.

Dans une étude similaire sur la coagulase de *Bacillus amyloliquefaciens* ,**Talantikite *et al.*, (2012)** ont obtenu le même résultat. En outre, **Ding et *al.*, (2011)** ont rapporté une activité optimale de 50mM pour la protéase *Bacillus subtilis* B1. Cependant, **Garnot et Martin (1980)** ont noté que l'activité optimale de la présure animale a été constatée pour une concentration en $Cacl_2$ de l'ordre de 20mM. Par ailleurs dans une étude comparative entre la présure animale et l'extrait coagulant des fleurs de cardon **(Zikiou, 2013),** il a été montré que l'extrait coagulant des fleurs de

Cardon et la présure animale présentent une activité optimale à la même concentration de $Cacl_2$ (20mM). Aussi, on peut conclure que les enzymes d'origine microbienne sont les plus sensibles à la baisse des concentrations en $CaCl_2$.

I.6.4. Influence de la concentration en extrait enzymatique brut

L'activité des extraits coagulants, en fonction de la concentration en extrait, a été estimée en mesurant le temps de coagulation pour des concentrations variables en protéines de l'extrait 0.04 à 0.175 mg/ml.

Les résultats représentés par **la figure 23** montrent une augmentation progressive de l'activité coagulante au fur et à mesure de l'accroissement des concentrations de l'extrait. Cependant, dans l'intervalle de concentration testé, nous n'avons pas observé de pallier correspondant à une concentration saturante en enzyme.

Abdellaoui (2007), a fait la même observation lors de son étude sur les protéases *d'Aspergilus Niger*. D'une manière générale, nos résultats concordent avec les travaux de **Garnot et Martin (1980) et Sbodio et *al.*,(1997),** qui ont montré que l'activité coagulante de la présure augmente progressivement en fonction de sa concentration.

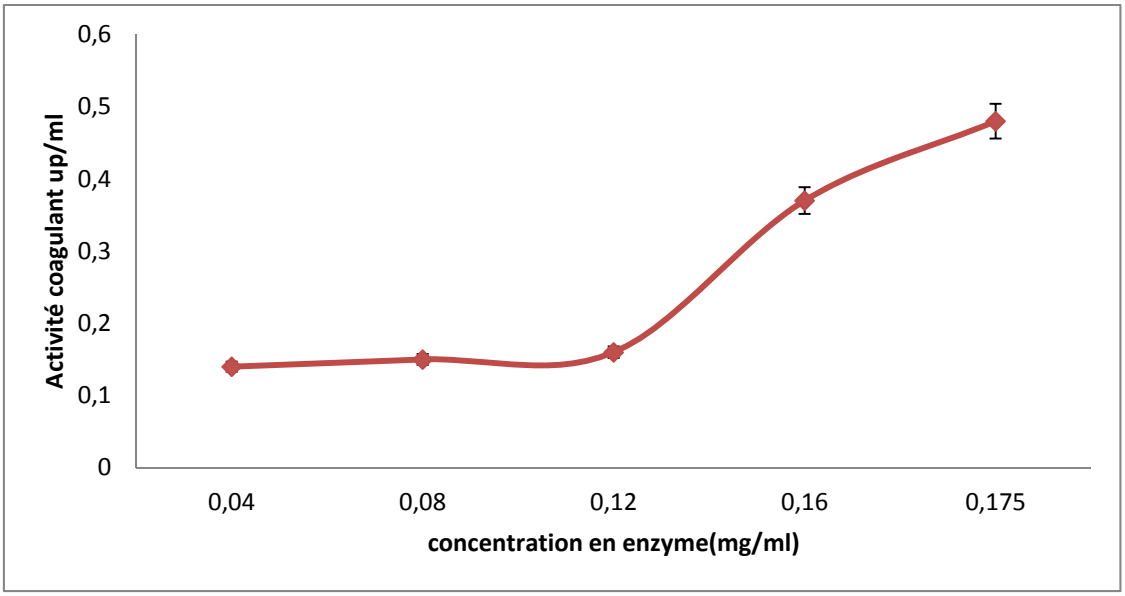


Figure 23 : Effet de la concentration en extrait enzymatique brut.

I.6.5.Etude de la stabilité de l'EEB

1. Stabilité thermique de l'EEB

L'influence de la température sur la stabilité thermique de l'extrait enzymatique brut a été étudiée en maintenant notre extrait à des températures variant dans l'intervalle de 30°C à 60°C. Le temps d'exposition est de 30 min.

Les résultats illustrés par la **figure 24**, montrent une stabilité à 35°C avec une activité coagulante de 0.49±0.01 Up/ml, pour des températures supérieures à 35°C, cette activité diminue progressivement, puis s'annule à 60°C (inhibition totale des protéines enzymatique). **Nouani et *al.*, *(*2009)**, rapportent une température de stabilité maximale comprise entre 30°C et 40°C pour la présure commerciale et de 30°C à 50°C pour les protéases de *Mucor pusillus* pendant 30 min d'incubation.

Cependant **He et *al.*, (2011)**, ont signalé une stabilité à 35°C pendant 60 min pour les coagulases de *Bacillus amyloliquefaciens* D4, elle est plus stable par rapport à notre coagulases étudiée mais elle est inhibée à 55°C pendant 20 min. **Shieh et *al.*, (2009)**, ont observé une stabilité à 55°C pendant 40 min pour la protéases de *Bacillus subtilis* natto puis elle est inhibée à 65°C pendant 30 min.

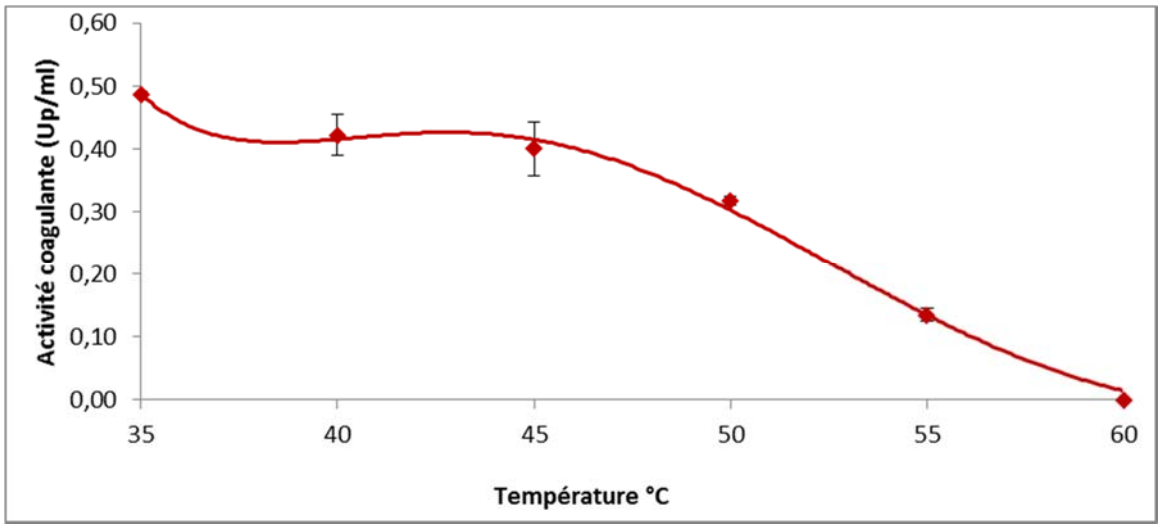


Figure 24 : Stabilité thermique de l'extrait enzymatique brut après 30 min d'incubation**.**

2. Stabilité au cours de la conservation à 4°C et -18°C

Pour estimer le temps à la conservation de notre enzyme à l'état brut, cette dernière a été entreposée à la température de 4°C et -18°C pendant 40 jours de

stockage. A cet effet, la mesure de l'activité coagulante est effectuée périodiquement (chaque 10 jours).

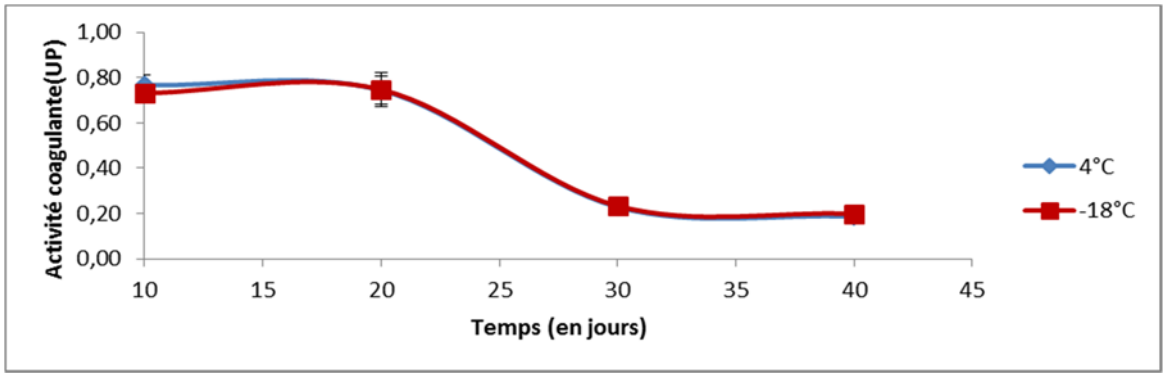


Figure 25 : Stabilité de l'extrait enzymatique brut au cours de la conservation.

Les résultats, illustrés par la **figure 25**, indiquent une baisse significative de l'activité à partir du vingtième jour de conservation à +4° C et même à -18°C, et ce, jusqu'à atteindre une valeur d'activité inférieure à 0,25 Up. Au-delà de cette valeur, et jusqu'en fin de durée de conservation, l'activité coagulante de la protéase *Bacillus amyloliquefaciens* continue à baisser progressivement de la même manière quoique soit la température (+4°C, ou -18°C) à laquelle l'extrait enzymatique est soumis. Or, **Belhamiche (2005)** dans son étude sur *Mucor pusillus* a montré que l'activité de la coagulase reste stable au cours de la durée de stockage de plus de deux mois à –18° C. De même, **Abdellaoui (2007),** note que l'extrait enzymatique de *Niger aspergillus* est mieux conservé à -18°C qu'à 4°C.

A partir de ces résultats obtenus dans la **figure 25,** on peut conclure, que l'enzyme de *Bacillus amylolequifaciens* est indifférente aux conditions de conservation (température) c'est-à-dire que son activité coagulante ne peut être affectée et déstabilisée que par la longueur de la durée de conservation. Par ailleurs, et comme l'activité coagulante ne reste stable que pour une courte durée de conservation (moins de 20 jours), on peut dire que l'enzyme coagulante extraite à partir de *Bacillus amyloliquefaciens* est peu stable durant la conservation dans nos conditions.

II. Analyses physicochimiques du lait

Les résultats des analyses physico chimiques de lait obtenu à partir d'un appareil EKOMILK, sont indiqués dans **le tableau 07**

Cet appareil permet la mesure par ultrasons à plusieurs avantages :

- Résultats affichés en moins de 90 sec ; sans besoin de la présence de l'opérateur et pour 10 paramètres différents.
- Permet de faire un grand nombre de mesures.
- Pas besoin de préparation, d'homogénéisation ou de chauffage des échantillons.

Tableau 07 : Composition physico-chimique du lait utilisé dans la fabrication du fromage.

Paramètres	Valeur obtenue	Normes (AFNOR) (1981)
Acidité (D°)	17	14-18
MG (g/l)	4.46	3,4-4.4
Densité à 20°c	1.02	1,028-1,033
Point de congélation	-0,458	-0,520-0,550
ESD (g/l)	79,04	62
EST (g/l)	74,58	90
pH	6,4	6,4-6,8



Figure 26 : EKOMILK pour les analyses physico chimiques de lait

Le pH et l'acidité sont les deux paramètres clé qui nous renseignent sur la fraicheur et la stabilité du lait.

La valeur du pH du lait est de l'ordre de 6,4, cette valeur légèrement acide pourrait s'expliquer par la teneur faible en caséines, par la nature d'alimentation ou par l'état physiologique de la femelle et elle est conforme à la norme **(AFNOR, 1998).**

D'après **Gorban et Izzeldin**, **(1997)**, le pH et le goût du lait peuvent être affectées par l'alimentation et la disponibilité d'eau et le stade de lactation et de l'état sanitaire de la mamelle (**Mathieu, 1998**).

Selon **Carole (2002),** le pH dépendrait également de la présence de caséines et d'anions phosphoriques. Un faible changement de pH du côté acide à des effets importants sur l'équilibre des minéraux (formes solubles et insolubles) **(Alais et Linden, 1997).**

La valeur d'acidité calculée pour ces analyses (17 °D) est conforme aux normes AFNOR **(1981)** fixé entre 14-18. En effet Selon **Mathieu (1998)**, le lait de vache en début de lactation présente une acidité titrable de 19°D à 20°D.

L'étude réalisée par **Aggad et *al*., (2009)**, a donné lieu à des acidités titrables des laits de mélange du même ordre de grandeur. Selon ces mêmes auteurs, ces similarités peuvent être liées au climat, au stade de lactation, à la saison et à la conduite d'élevage notamment l'alimentation et l'apport hydrique.

L'acidité du lait peut être un indicateur de la qualité du lait au moment de la livraison car elle permet d'apprécier la qualité d'acide produit par les bactéries ou les éventuelles fraudes **(Joffin, 1999).**

La valeur de la densité du lait analysé est conforme aux normes requise qui se situe entre 1,028 et 1,035.

La densité dépend directement de la teneur en matière sèche, liée fortement à la fréquence d'abreuvement. Ce qui explique la variabilité des valeurs entre les différents échantillons de laits analysés et entre celles citées dans la littérature **(Siboukeur, 2007).** Donc la Densité du lait c'est un paramètre clé pour évaluer la qualité d'un lait. Un lait riche en matière grasse a une densité faible et inversement.

Les résultats de l'analyse montrent que la teneur en extrait sec total est inférieure à la norme (74.58 g/L).

Plusieurs auteurs ont montré que la variation de la teneur en extrait sec total était due à divers facteurs tels que la qualité de l'eau et sa quantité disponible pour les animaux (**Khaskheli *et al.*, 2005**). La teneur en matière sèche du lait varie également en fonction du stade de lactation (**Bengoumi *et al.*, 1994** ; **Khaskheli *et al.*, 2005**), des facteurs saisonniers, de l'environnement, du rang de lactation, du nombre de vêlages (**Yagil, 1982 ; Khaskheli *et al.*, 2005).**

Par ailleurs, la teneur en extrait sec dégraissé d'échantillons du lait analysés semble supérieure à la norme AFNOR (62 g/l).

Un taux d'extrait sec dégraissé relativement élevé dû selon **Havemose et *al*., (2004)**, à certains facteurs tels que : la saison, l'état sanitaire et l'alimentation.

D'après **Lederer (1983)**, un lait de très bonne qualité contient 40g/l de matière grasse, donc la teneur moyenne en matière grasse calculée présente une qualité moyenne, dans notre étude la valeur calculée de la matière grasse est un peu supérieure à la Norme donnée par le journal officiel qui situe entre (3,4 et 4,4 g/l).

Cette richesse en matière grasse peut être due à la race bovine exploitée, et à des conditions d'élevage telles que le stade de lactation, l'alimentation, la traite **(luquet, 1985).**

III. Essai de fabrication d'un fromage à pâte pressée cuite

Afin d'évaluer la qualité des fromages obtenus avec l'EEB et avec la présure commerciale nous avons déterminé leurs caractéristiques physicochimiques, microbiologiques et sensorielles.

III. 1. Analyses physicochimiques du fromage

Nous avons fabriqué deux types de fromages à pâte pressée cuite référenciés comme suit :

F_{EEB}: fromage élaboré à partir de l'EEB.

F_p : fromage élaboré à partir de la présure.

Les résultats physicochimiques des deux fromages fabriqués comparé avec le fromage issu à partir d'une coagulation par l'extrait floral sont mentionnés dans le **tableau 08**

Tableau08 : Résultats physicochimique des fromages obtenus.

Paramètres	F_p	F_{EEB}
pH	5 ,10	5,34
Acidité	17,1	10,8
Matière grasse : MG (%)	28	24
Extrait sec total : EST (%)	49,54	46,13
Extrait sec dégraissé : ESD (%)	21,54	22,13
Rapport Gras/Sec (%)	56,6	52,02

Les résultats des analyses physicochimiques indiquent que :

- **PH**

Les résultats obtenus montrent que de F_{EEB} sont légèrement élevée para port a pH de $F_{P.}$ Alor une y pas une différence comparable entre les deux type de fromage. Il est également un facteur important dans le contrôle de la croissance bactérienne dans le fromage.

Il s'avère important de noter que le pH est lie 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 pH plus bas **(Alais, 1984)**

- **Acidité et matière grasse**

L'utilisation de l'extrait enzymatique de *Bacillus amyloliquefaciens* donne un fromage avec une acidité et une teneur en matière grasse qui sont faible comparables à celles trouvées dans le fromage à base de présure. Ceci d'ailleurs était confirmé par plusieurs auteurs qui ont rapporté dans leurs travaux que l'acidité et le taux de matière grasse des fromages ne dépendent que de la nature et de la composition initiale du lait utilisé pour la fabrication **(Sousa *et* Malacata, 2002 ; Roseiro *et al.,* 2003 ; Aquilanti, 2011).** Le taux de matière grasse du fromage dépend de la composition du lait mis en oeuvre, ainsi que la manière de coaguler le lait et de travailler le caillé.

- **Extrait sec totale**

Cependant, nous notons un faible taux d'extrait sec total de F_{EEB} de *Bacillus amyloliquefaciens* Par rapport le fromage à base de présure.

Le taux de l'extrait sec varie d'un type de fromage à un autre, dans de larges limites, et dépend d'une part de la composition initiale du lait et d'autre part de la manière dont sont effectués la coagulation et l'égouttage. Ces paramètres déterminent le taux de l'extrait sec du fromage **(Alais, 1984).**

- **Extrait sec dégraissé**

Nous remarquons que ce rapport est plus légèrement élevé dans le cas du fromage obtenu par la coagulation avec l'extrait enzymatique de Bacillus *amyloliquefaciens* comparé à la présure.

❖ **Rapport Matière Grasse/ Extrait sec total,**

Le rapport Matière Grasse/ Extrait sec total, caractéristique importante des fromages. Il permet d'apprécier d'une façon précise la teneur en matière grasse dans 100g d'extrait sec total **(Veiisseyre, 1975**). Nous remarquons que notre rapport qui correspond à Fp est élevé en comparé avec FEEB.

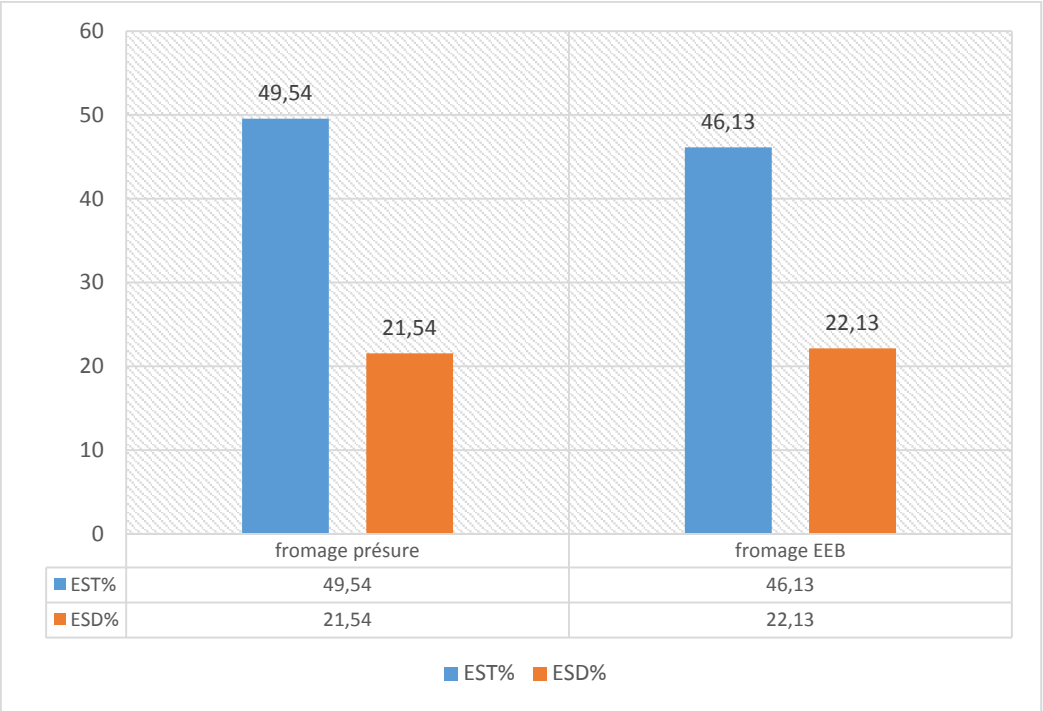


Figure 27 : Variation des teneurs en EST et ESD des deux types de fromage

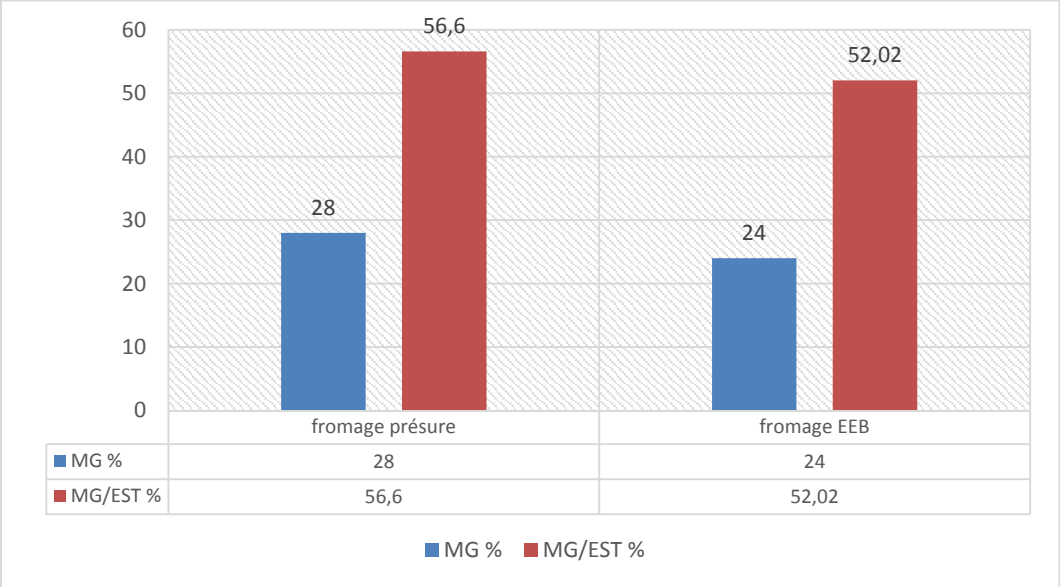


Figure 28 : Variation de la MG et MG/EST des deux types de fromages.

Le rapport Matière Grasse/ Extrait sec total, caractéristique importante des fromages.

La **figure28** montre que ce rapport est relativement faible pour le fromage EEB en comparant à celui élaboré par la présure commerciale.

III.1.1. Rendement fromager

Le rendement fromager est une des données les plus importantes pour une fromagerie. En effet, la quantité de fromage généralement obtenue est faible par rapport à la quantité d'ingrédients mis en œuvre (il faut environ 100 Kg de lait pour obtenir 10 à 12 kg de fromage**).**

Selon la **figure29** on constate une différence du rendement fromager entre les deux échantillons de fromage. Ce rendement semble plus important pour le fromage préparé avec l'EEB (42,11%) par rapport à celui fait à base de la présure (31,74%).

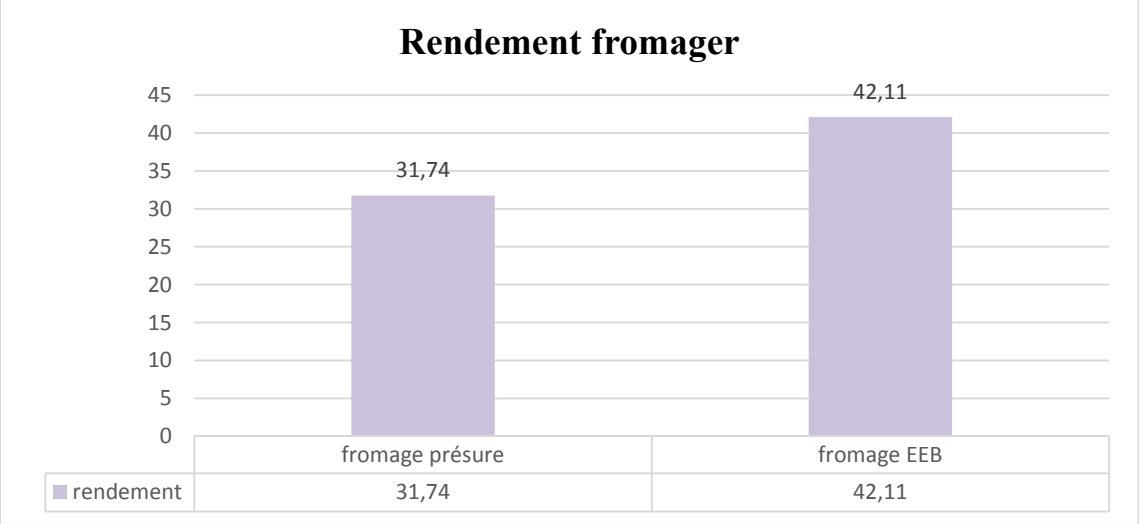


Figure29 : Rendement fromager des deux échantillons de fromage.

Les facteurs influençant le rendement des fromages sont divers, tel que le traitement thermique, le salage **(El-Gawad et Ahmed, 2011 ; J.Hardy, 1986)**, le pressage et la durée d'affinage **(El-Gawad et Ahmed, 2011).**



Figure 30 : Fromage fait à base d'EEB.

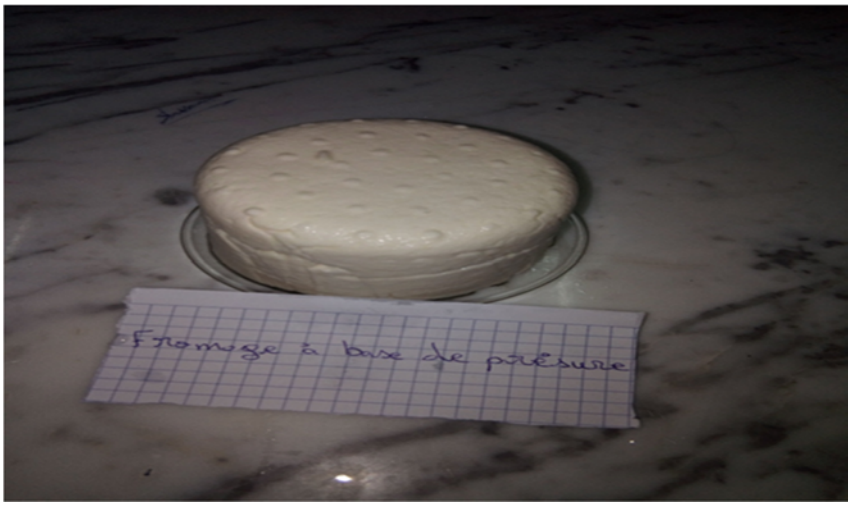


Figure 31 : Fromage fait à base de la présure.

III. 2. Analyses microbiologiques du fromage

Les résultats des analyses microbiologiques des deux fromages étudiés sont mentionnés dans **le tableau 09.**

Tableau 09 : Résultats des analyses microbiologiques des deux fromages selon les normes algériennes des fromages frais **(J.O.R.A).**

Flore	Résultat	Limites microbiologiques (ufc (1)/g ou ufc/ml)
Coliformes totaux	Absence de trouble	3×10^2
Coliformes thermo tolérants	Absence de trouble	30
Salmonella	Absence	Absence
Staphylococcus aureus	Absence	3×10^2
Clostridium sulfito-réducteur	Absence	Absence

Les analyses microbiologiques permettent de vérifier que le produit ne présente pas de risque pour la santé du consommateur, en tenant compte des conditions de conservation, des habitudes de consommation et des caractéristiques du produit.
Il convient donc de s'assurer, par des tests microbiologiques que le produit va être sain et de bonne qualité.
Notre analyse microbiologique a montré une absence totale des germes rechercher tel que : Les coliformes totaux et fécaux, *staphylococcus aureus*, salmonelles et *Clostridium*
Donc, notre produit est de qualité microbiologique satisfaisante concernant tous les germes recherché et ceci conformément à l'arrêté interministériel n°35 du 24/01/98 du journal officiel.

III. 3.Analyses sensorielles

L'évaluation sensorielle est un ensemble de techniques et de pratiques qui visent à mesurer et interpréter de façon systématique les perceptions de l'Homme **(Kergoat, 2010).** En effet, la qualité sensorielle des fromages dépend d'un grand nombre de facteurs, liés à la fois à la technologie de fabrication et aux caractéristiques chimiques et microbiologiques de la matière première (**Coulon et *al*., 2005**).

Dans la présente étude, l'analyse sur la dégustation des fromages, en choisissant un panel de 10 dégustateurs. L'évaluation a été effectuée par le remplissage d'une fiche de dégustation établi sur les critères de couleur, d'odeur, Epaisseur de la pâte, homogénéité, salinité et dureté. Les résultats des analyses des deux échantillons sont

représentés sous forme de tableau récapitulatif **(voir tableau 10)** et d'histogrammes **:33-34-35-36-37-38, (Voir annexe 12).**

- **Test de classement par rangs**

Ce test a pour objectif de déterminer la mesure dans laquelle le consommateur accepte un produit. L'acceptation d'un produit alimentaire indique en général la consommation réelle de ce produit Les évaluations sensorielles des produits expérimentaux sont réalisées dans une salle au laboratoire microbiologique de la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie- Université de Yahia farés Médéa.

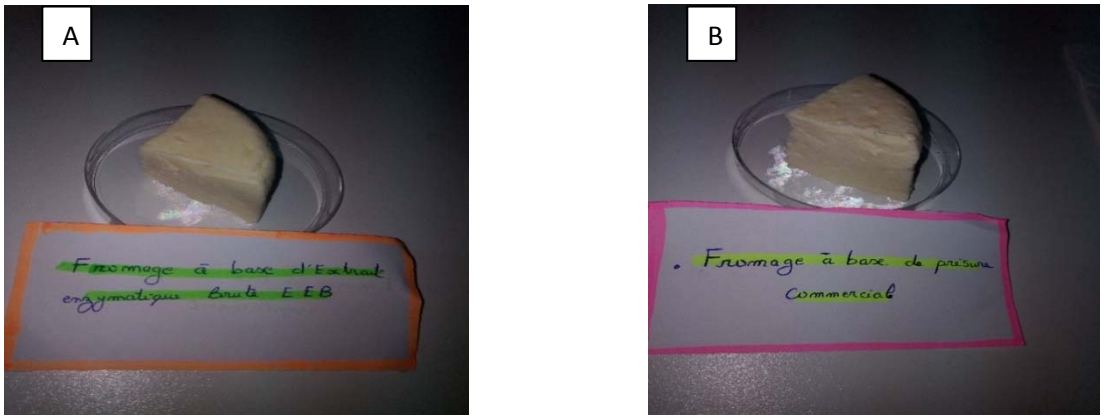


Figure 32 : échantillons de fromages pour la dégustation (A : fromage à base d'EEB ; B : fromage à base de présure.

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des résultats de test de dégustations obtenus sur les Fromages élaborés.

Fromage / Caractère	F p		F EEB	
	MS	**SR**	**MS**	**SR**
Couleur	4.6	16	4.8	14
Epaisseur de la pate	5.1	17.5	5.7	12.5
Homogénéité	5.2	16	5.6	14
L'odeur	1.9	15.5	2.2	13.5
La salinité	3	16.5	2.8	13.5
La dureté	3.7	16.5	4.4	13.5

MS : Moyenne des scores **SR :** Somme des rangs

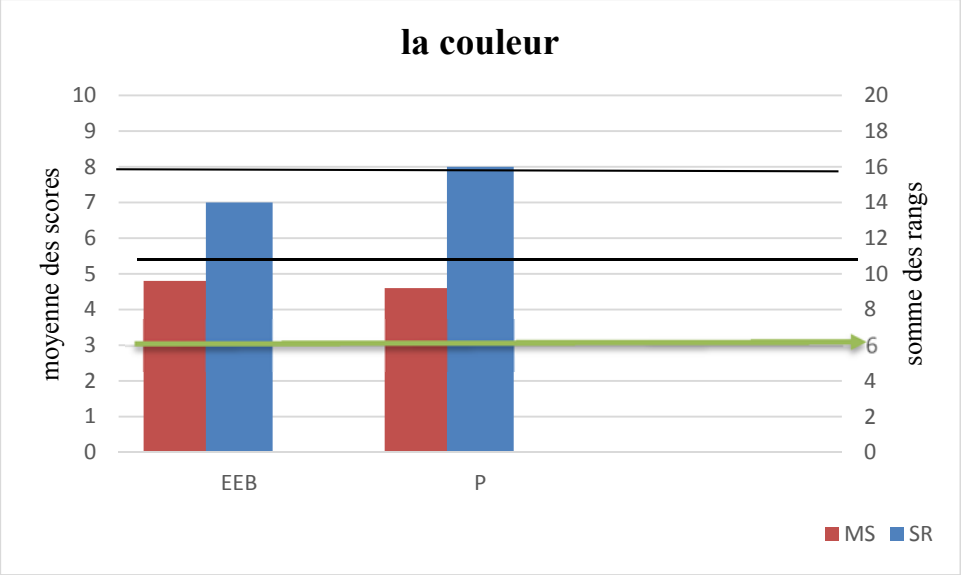


Figure 33 : Histogramme des résultats des analyses de la couleur des fromages fabriqués.

La différence observée est non significative dans l'intervalle 11-16 (zone entre les traits pleins).

Sur le plan couleur et selon **la somme des rangs (SR),** aucune différence significative n'est observée entre les deux fromages faits à base présure et de EEB Toutefois, **les moyennes des scores** relevés pour les deux fromages se rapprochent les unes des autres et sont supérieur à limite acceptable.

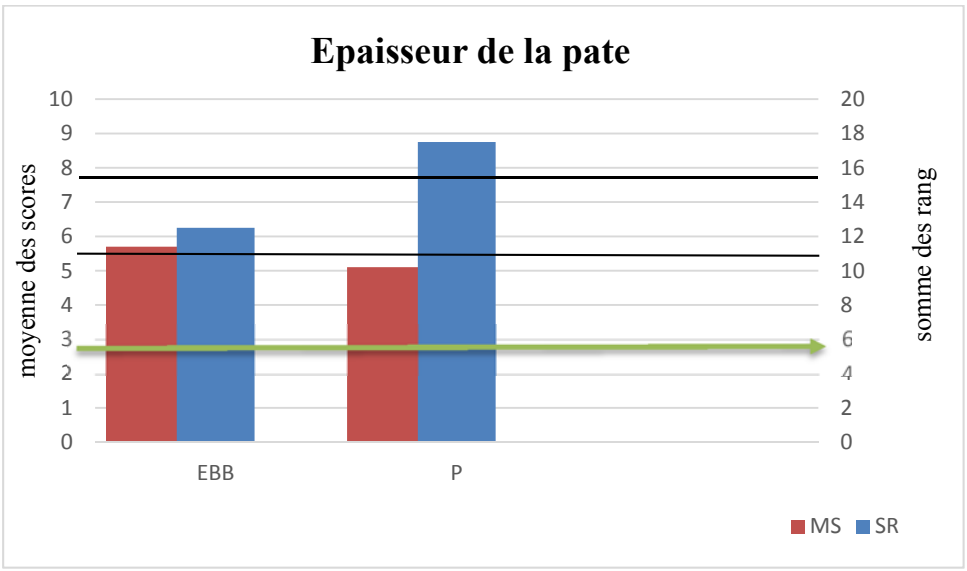


Figure 34 : Histogramme des résultats des analyses de la texture des fromages fabriqués.

La différence observée est non significative dans l'intervalle **11-16** (zone entre les traits pleins).

Selon **la somme des rangs** (SR), le fromage à base de l'EEB se situe dans l'intervalle de signification [11,16] et pour le fromage à base de présure se situe au-dessus de la limite supérieure de signification, il est donc statistiquement mauvais. Toutefois, les moyennes des scores relevés pour les deux fromages se rapprochent les unes des autres et sont **supérieure à** limite acceptable.

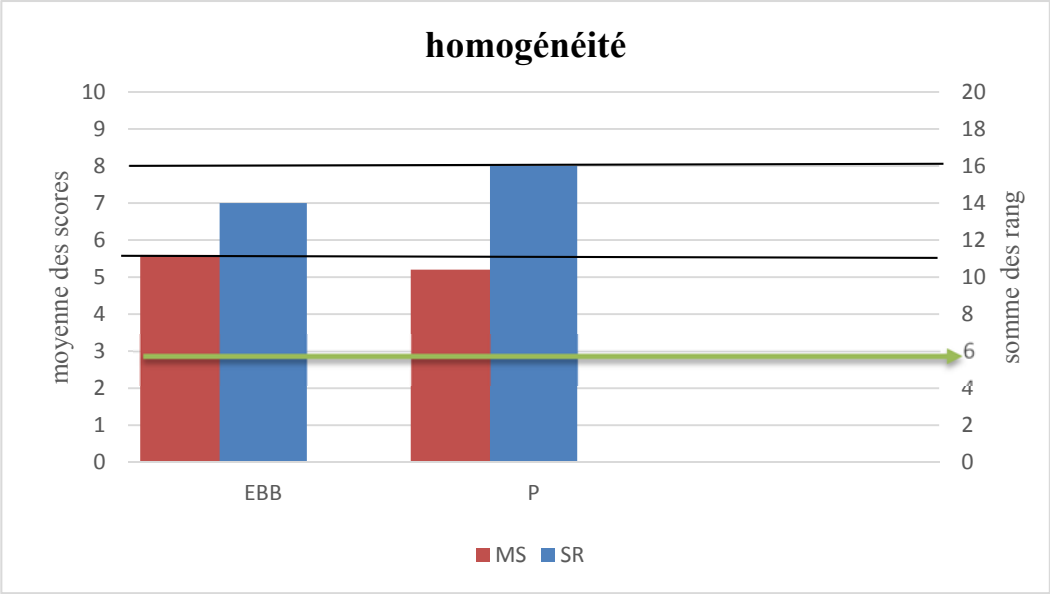


Figure 35 : Histogramme des résultats des analyses de l'homogénéité des fromages fabriqués. La différence observée est non significative dans l'intervalle **11-16** (zone entre les traits pleins).

La somme des rangs des deux fromages figure dans l'intervalle d'acceptabilité 11-16, cela signifie qu'il n'y a pas de différence significative d'homogénéité entre les deux fromages. De plus, les moyennes des scores données pour les deux types de fromage ne présentent pas une grande différence et sont inférieure à limite acceptable.

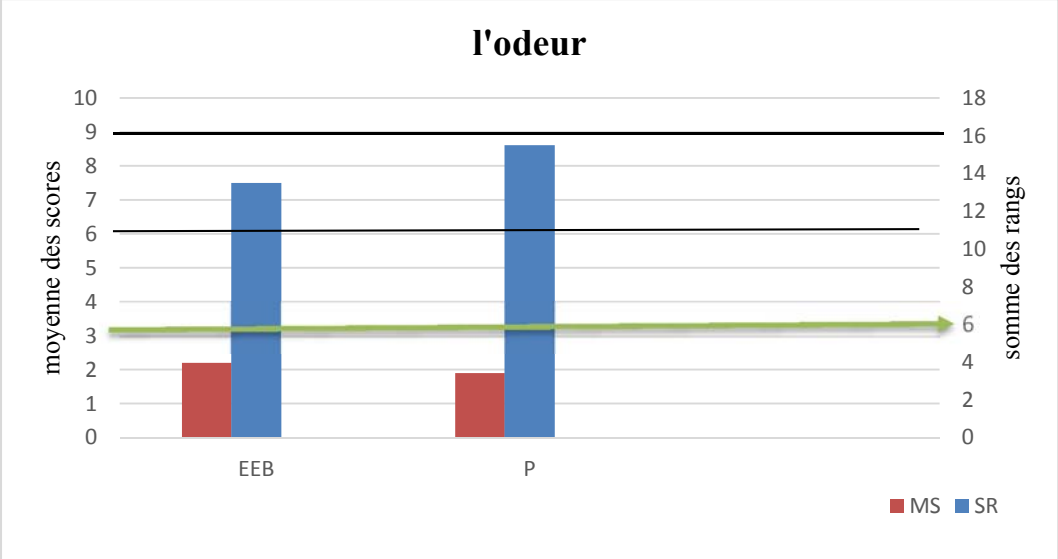


Figure 36 : Histogramme des résultats des analyses de l'odeur des fromages fabriqués.
La différence observée est non significative dans l'intervalle **11-16** (zone entre les traits pleins).

Sur le plan odeur, **la somme des rangs** des deux fromages se situe dans l'intervalle d'acceptabilité 11-16, cela signifie qu'il n'y a pas de différence significative en odeur entre les deux fromages. Toutefois, **les moyennes des scores** attribuées par les panélistes aux deux types de fromage sont égales et sont inferieure à limite acceptable.

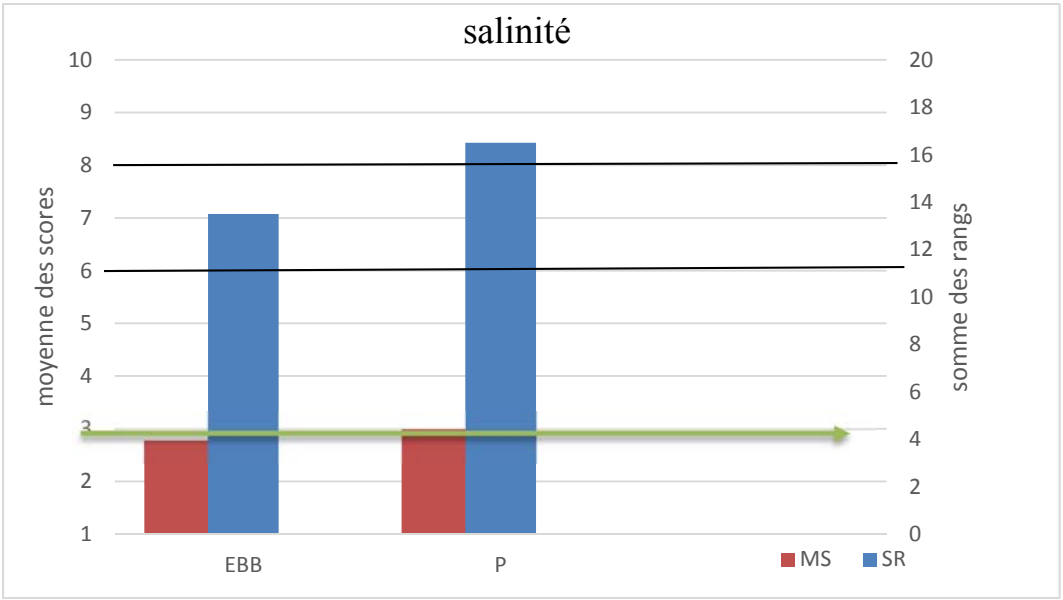


Figure37 : Histogramme des résultats des analyses de la salinité des fromages fabriqués.

La différence observée est non significative dans l'intervalle **11-16** (zone entre les traits pleins).

Selon **la somme des rangs** (SR), le fromage à base de l'EEB se situe dans l'intervalle de signification [11,16]. Or, Le fromage présure, présente une somme des rangs (SR) supérieure à la limite acceptable, il est donc statistiquement mauvais.

La moyenne des scores attribuée aux deux fromages (3 et 2.8) respectivement pour le fromage présure et le fromage EEB, permet de constater que la salinité est appréciée par l'ensemble des panélistes.

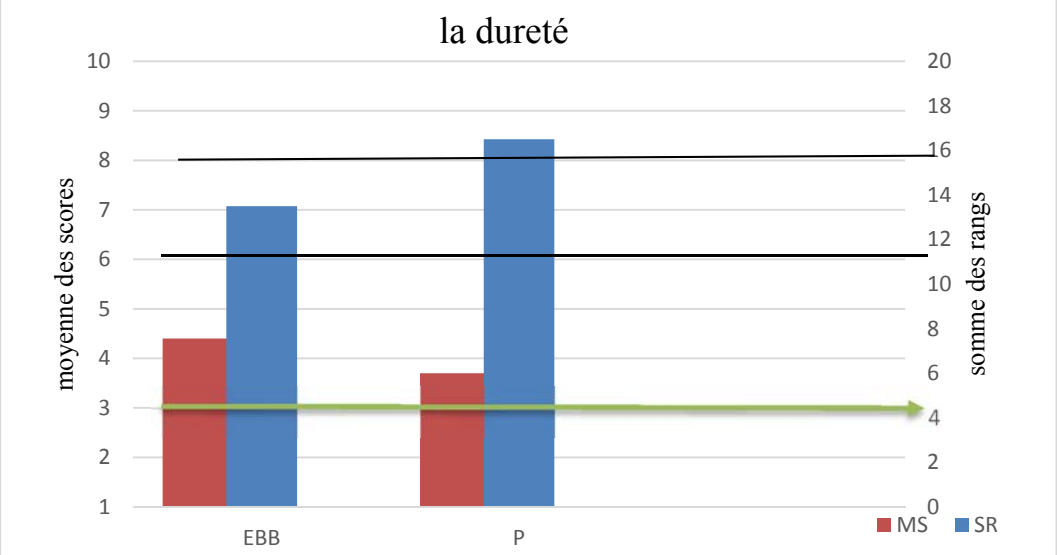


Figure 38 : Histogramme des résultats des analyses de la dureté des fromages fabriqués.

La différence observée est non significative dans l'intervalle **11-16** (zone entre les traits pleins).

Sur le plan dureté et selon **la somme des rangs** (SR), aucune différence significative observée entre les deux fromages faits à base présure et de EEB.

Les moyennes des scores relevés pour les deux fromages se rapprochent les unes des autres et sont supérieure à limite acceptable.

CONCLUSION

Conclusion

La pénurie mondiale en présure à susciter le développement de la recherche des nouveaux succédanés capables de coaguler le lait, tout en assurant de bons rendements fromagers. Dans cet objectif, la production de la protéase acide extracellulaire par la souche Bacillus *amylolequifaciens* isolée localement, sur un résidu agroalimentaire peu couteux fermenté par des cultures solides (*SSF*), a été optimisée de façon à obtenir la meilleure activité coagulante.

Les conditions de fermentation sur milieu solide (30g supplémenté de 2,5 g de lait écrémé dans 60ml de sulfate d'ammonium (NH4)2SO4 à 0,1% (poids/vol)) avec une durée d'incubation de 24 h à une température de 32 °C.

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut a été déterminée par la méthode de Berridge, sur les conditions standards (35C° ; pH =6 ,4 ; 0,001 M de CaCl2), en outre l'activité protéolytique a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre a une D.O de 660 nm.

Par ailleurs, L'extrait enzymatique brut est caractérisé par une activité coagulante de 0.416 Up, avec une activité protéolytique élevée de 0.522 DO660 et un indice AC/AP de 0.796.

D'autre part, Les paramètres influençant l'activité optimale de l'extrait enzymatique brut ont été déterminés. L'activité optimale a été observée à une température de 75°C, une concentration en CaCl2 de 0,08M et un pH de 5,5.

En effet, pour résoudre le problème causé par l'activité protéolytique élevée de L'EEB et inhiber totalement la protéolyse générale, nous avons orienté la fabrication vers un fromage de type pressé à pâte cuite. En effet, Le processus de fabrication appliqué permet par le moyen de la cuisson après le brassage du caillé d'inhiber l'activité protéolytique de l'enzyme et de réduire les pertes en rendement fromager.

Les résultats du rendement fromager montrent que le fromage préparé avec l'EEB (42.11%) est plus important par rapport à celui fait à base de la présure (31.74%).

Les tests sensoriels des différents échantillons des fromages n'ont pas montré une différence significative entre ceux obtenus à partir de l'extrait enzymatique brut et la présure commerciale.

A l'avenir, il serait opportun de compléter notre présent travail par d'autres études plus approfondies notamment :

- Optimiser les paramètres de production de l'enzyme (pH, milieu de culture, Le substrat).
- Optimiser les paramètres de l'activité enzymatique.
- Optimiser les paramètres de la conservation.
- Purifier l'enzyme par chromatographie échangeur d'ions.
- Rechercher l'existence d'une enzyme extracellulaire ayant une activité coagulant.
- Améliorer les performances de la souche par manipulation génétique.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdoune, O., 2003. De Magister en Sciences Alimentaires Option Nutrition Appliquée Qualité du fromage à pâte molle type Camembert fabriqué à la laiterie de Draa Ben Khedda : nature de la matière première et évaluation de l'activité protéolytique au cours de l ' affinage', p. 88**.**

Abdellaoui, R., 2007. Obtention et caractérisation d'une Enzyme Coagulant le lait D'aspergillus Niger Isole au Sol de la région de Boumerdés. Thèse de Magister en génie Alimentaires. Faculté des Sciences de l'Ingénieur. Université de Boumerdès. 96p.

Abdellaoui R., 2007. Obtention et caractérisation d'une enzyme coagulant le lait *d'aspergillus niger* isolé du sol de la région de Boumerdès. Thèse de doctorat.Université de M'hamed Bougara de boumerdes, Boumerdes, Algérie, 74p.

Ahmed S. A., Helmy W. A., 2012. Comparative evaluation of *Bacillus licheniformis* 5A5 and Aloe variegata milk-clotting enzymes. J. of Chem. Engine., 29 (1), p.69 – 76.

Abdel-Fattah. A. F. El-Hawwary. N. M., 1974. Studies on the production of milk-clotting Enzymes, Protéolytic Enzymes and Mucilage by Fungi. Journal of General Microbology.84, 327-331.

Abderrahmane A.M., Madkor S.A., Shalabi S.I., Ettwall N.H., 1990. Rabbit pepsin asa rennet substitut, 1-Extraction, purification, and Characterization of the enzyme. Minia.J.Agric. Res. And Dev., 12(3), p.1685-1702.

AFNOR., 1981. Lait et produit literie, méthodes d'analyses, recueil des normes française Ed, AFNOR-paris.

Alais C., 1974. Principes des techniques laitières : science du lait. Ed : Publicité, Paris. 513p.

Alais Lalinde G., 1997. Abrégé de Biochimie Alimentaire. Masson, 3ème Ed.

Aggad H., Mahouz F., Ahmed Ammar Y et Kihal M. ,2009. Evaluation de la qualité Hygiénique du lait dans l'ouest algérien. Revue Méd. Vét., 160, 12.pp : 590-595Paris

Almeida, C. M., Gomes, D., Faro, C., ET Simões, I. ,2015. Engineering a cardosin B-derived rennet for sheep and goat cheese manufacture. Applied microbiology and biotechnology, 113.

Amiot J ; Fourier S ; Lebeuf Y. ; Paquin P ET Simpson R., 2002. Composition propriété physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. IN : Science et technologie du lait – Transformation du lait, presse International, polytechnique, canada.

Références bibliographiques

Anema SG, Lee SK, Klostermeyer H., 2005. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ-casein and the gelation of skim milk by chymosin. LWT Food Science and Technology, 40: 99-106.

Annonyme1., 2008. Norme internationale, OMS, organisation mondiale de la santé, Détermination de la teneur en matière grasse ,2446 FIL226, deuxième édition

Andreeva, N.S., and Rumsh, L.D., 2001. Analysis of crystal structurs of aspartic proteinases : on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes Protein Sci. 10:2431-2450

Anifantakis,E., And Green, M.L., 1980. Preparation and properties of rennets from lamb's and kid's abomasa. Journal of Dairy Research. 47: 221-230

Anstrup K., 1980. Protéinase. In : microbial enzymes and bioconversions. Ed. Rose A.H.Academic Press, 93-108.

Antonini, J., ET Ribadeau Dumas, B., 1971. Isolement, purification et propriétés de deux zymogènes gastriques bovins, propriétés des protéases correspondants. Biochimie, 53:321-329

Alais C., 1974. Science du lait ; principes des techniques laitières, 3ème ed, Publicité Sep, 807p.

Alais C., 1984. Sciences du lait, principes des techniques laitières, 4 ème édition, SEPAIC, 818 p.

Alais C., 1984. Science du lait. Principes des techniques laitières. Ed. SEPAIC, 4ème édition, 814p.

Alloggi V, Caponio F, Pasqualone A, Gomes Tommaso. , 2000. Effect of heat treatment on the rennet clotting time of goat and cow milk. Food Chemistry, 70: 51-55.

Aquilanti L., Babini V., Santarelli S., Osimani A., Petruzzelli A., Clementi F., 2011. Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. Letters in Applied Microbiology, 52, 651–659.

Audigger C.I., Figarella J. ET Zonzaine F. ,1980. Manipulation d'analyse biochimique. 4eme édition. Ed. Doin Paris p. 256.

Aviron-Violet P., Baret J.L., Bertrand C., Blazy B., Bouvier F., 1982. Les enzymes : Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. pp. 23; 123; 140–153.

Awad S. 2005. Effect of sodium chloride and pH on the rennet coagulation and gel Firmness. LWT – Food Science and Technology, 40: 220-224.

B

Barbano, D. M., And Rasmussen, R. R. ,1992. Cheese yield pefromance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants J.dairy Sci. 75:1-12.1992.

Références bibliographiques

Blum M., Cunningham A, Bendiner M., Hofmann T., 1985. Penicillopepsin, the aspartic proteinase from *Penicillium janthinellum*: substrate-binding effects and intermediates in transpeptidation reactions. Biockem. SOC. Trans, 13, 1044-1046.

Boudjnah ., 2012. Evaluation de la qualité physico-chimique et biochimique et suivie de l'activité protéolytique du lait camelin (collecté localement) durant sa transformation en fromage

Boyaval,P., Corre,C., et Roussel,F., 1995. « Effect of free fattyacid on propionic acid bactéria.Le lait ».Vol:75.p 17-29.

Bohak, Z., 1970. Chicken pepsinogen and chicken pepsin In : Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes. Ed., G. E. Perlmann and L. Lorand, Acad.Press Inc., New York, V. 19, p.347-358, 1042 p.

BoutonnierJ.L ., 2012. Fabrication du fromage fondu', Techniques de l'Ingénieur, pp. 1–3.Available at : see_the_document_in_the_desktop_folder_Techniques_de_lingenieur.

Branger A., 2012 . Fabrication de produits alimentaires par fermentation : les ferments Techniques, 33, p. 17.

Brule, G., Lenoir, J., ET Remeuf, F. ,1997. La micelle de caséine et la coagulation du lait.

Brule G., Lenoir J., ET Remeuf F. ,1997. La micelle de caséine et la coagula du lait, In : Le fromage. Ed. A. Eck, et Gillis J.C. (coordonnateurs), pp 7-41, 3ème édition, Lavoisier Tec et Doc. Paris 891 p.

Belhamiche N., 2005. Extraction, purification et caractérisation de la coagulase de *Mucor pusillus.*Thèse de Magister. Université de M'hamed Bougara de boumerdes, Boumerdes, Algérie, 93p.

Brule G., Lenoir J., et Remeuf F., 1997. La micelle de caséine et la coagulation du lait. In Le fromage. Eck A., et Gillis J. C. Lavoisier, Tec & Doc., Paris, p.7-39.

C

Carson A, Hill C, Olson N .F., 1987. Kinetics of milk coagulation: III mathematical Modelling of the kinetics of curd formation following enzymatic hydrolysis of kappa-casein-parameter estimation. Biotechnology and Bioengineering, 29: 601-611**.**

Carole L.,Vignola., 2002. Science et technologie du lait.

Cathrine, Foucaud, S., 2005. La fabrication du fromage .Les connaissances, INRA. Paris.

Cayot P. et Lorient D., 1998. Structures et techno fonctions des protéines du lait Arilait Recherches, Lavoisier Tec. Et Doc. 363 p.

Références bibliographiques

Chamba, J.F., AND Irlinger, F., 2004. Secondary and Adjunct Cultures', Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology, 1(C), pp. 191–206. doi : 10.1016/S1874-558X(04)80068-X.

Chow, R.B., AND Kassell, B., 1968. Bovine pepsinogen and pepsin. I- Isolation, purification and some properties of the pepsinoge The Journal of Biological Chemistry Vol. 243, N° 8:1718-1724.

Choisy C., Desmaeaud M., Gueguen M., Lenoir J., Schmidt J., et Tourneur C., 1997 . Les phénomènes microbiens, Dans Le fromage (Coord. ECK A. et GILLIS J.C.), 3èm ed. Tec et Doc. Lavoisier. pp 377.

Codex Alimentaire, S., 2013 . Norme Générale Codex Pour Le Fromage.

Collin, J.C., Grappin, R. ET Legraet Y., 1977. Etude de la méthode de mesure, selon Berridge, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. Rev Lait. Franç., 355 : 389-394.

Coulon, J., Delacroix Buchet, A., Martin, B., Pirisi, A., 2005. Facteurs de production et qualité sensorielle des fromages. INRA Prod. Anim 18, 49-62.

Cuvelier , G.F.,1993. Production des enzymes In: Biotechnologie. Ed., R. Scribon, 4 ème ed, Technique et documentation Lavoisier, p.948

D

Dalgleish D G., 1992. The enzymatic coagulation of milk. Advanced Dairy Chemistry Proteins, 1: 579–619.

Ding Z., Liu S., Gu Z., Zhang L., Zhang K., Shi G., 2011. Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran. African Journal of Biotechnology, 10(46), p.9370-9378.

A**Dalgleish, D.G., 1997.** The Enzymatic coagulation of Milk. In Advanced Dairy Chemistry V1 Proteins. P.F. Fox Blackie and son Ltd. P579-619.

Dalgleish, D. G., 1998. Casein micelles as colloïds : Surface, structures and stabilités. J. Dairy Sci., 81 : 3013-3018.

Dalgleish, D.G., 2007. The casein micelle and its reactivity. Lait (87) : 385-387.

D'Ambrosio A, Rossano R, Uungaro N, AND Riccio P., 2003. Proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from crustaceans Munida. Journal ofMolecular Catalysis B : Enzymatic, 22: 145-150.

Daviau C., Famelart M. H., Alice P., Goudédranche H., Maubois J. L., 2000. Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: Effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Le Lait*, 80, 397-415.

Drohse H. B., Foltmann B., 1989. Specificity of milk-clotting enzymes towards bovine κ-casein, Biochimical and Biophysica Acta, 995, 221-224. And heat treatment. Lait, 80: 397 415.

Dohmers T., 1995. Dairy Processing handbook, 436p.

E

El Gawad, M.A.M.A., Ahmed, N.S., 2011. Cheese yield as affected by some paramètres review. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 10, 131-153.

El-Bendary M. A., Moharam Maysa E., AND Ali Thanaa H., 2007.Purification and characterization of milk-clotting enzyme production by *Bacillus sphaericus*.Journal of Applied Sciences Research, 3 (8) : 695-699.

Elagamy E.I., 2000. Physicochemical, Molecular and Immunological Characterization Of Camel Calf Rennet: A Comparison With Buffalo Rennet. J. Dairy Res. 67: 73-81.

Ernstrom, C.A., AND Wongt, N.P., 1983. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In: Fundamentals on dairy chemistry. Ed., B.H. Webb, A.H.Johnson and J.A. Alfold .2ème ed.The Avi publixhing Company Inc, p. 662-771, 929p.

Ernstrom, C.A., AND Wongt, N.P., 1983. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In : Fundamentals on dairy chemistry. Ed., B.H. Webb, A.H.Johnson and J.A. Alfold **.**2ème ed, the Avi publixhing Company Inc, p. 662-771, 929p

Eck A., 1987. Le fromage. Paris, Lavoisier, Tec et Doc., 891p.

Eck ., 1987 . Le fromage, Ed : TEC et DOC, Lavoisier.

Eck & Gillis. (1997). Le fromage de la science à l'assurance qualité.3éme Ed.

Emanuel G., Lorrence H. G.(2009). Practical handbook of microbiology.CRC press. USA. 13: 978-0-8493-9365-5.

F

FAO., 2002.Lait et produit literies dans la nutrition humain. Collection FAO/Alimentation et nutrition .28, 7 p

FAO.,2013. Lait et produit literies dans la nutrition humain.Collection FAO/Alimentation et nutrition .28, 7 p.

FAO ., 1995.Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine', Collection FAO/ Alimentation et nutritio*n*, (2), pp. 1–23.

Fan Zhu Et. Al ; 2011. Carbohydrate Research, 346 (9), 1112 – 1121.

Sweetpotato amylopectin was subjected to partial hydrolysis by α-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* to release the clusters.

Fox p.f. ,2003. Milk proteins : général and historical aspects. In : Advanced Dairy Chemistry : Proteins, vol. 1, pp. 1–48.

Fox P. F ; Kelly A. L ; 2004. The Caseins ; In Proteins in Food Processing, YADA R.Y, ed. Boca Raton, FL: CRC Press., 29–71.

Fredote. ,2005. Connaissance des aliments –Bases aliments et nutritionnelles de la diététique .Paris, London, Newyork, Edition TEC et DOC, 397 pages.

G

Garnot P., **Martin P**., **1980.** La présure: composition,activité, son rôle en fromagerie, La tech Laitière. 930 (3). p. 27-30.

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, (2004).

Gaucheron F., and Michel S.F., 2004. Pp 471-583. Dans minéraux et produits laitiers de Gaucheron F. Ed.Lavoisier, Tec et Doc, Paris.905p

Gelais ET Tirard Collet S T. ,2009 . Fromage : Science et technologie du lait transformation du lait .ED/ISBN. Canada. P 345**.**

Goldman, E., & Green, L. H., 2009. Practical Handbook.

Gourraud J., 1985. Composition et propriétés physico-chimiques. Laits et produits laitiers. 1ère éd. Paris : Technique et documentation Lavoisier, 1985. Vol.1, Chap.1, 1-90.

Goursaud J., 1985. Composition et propriétés physico-chimiques. Dans Laits et produits laitiers vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits de la mamelle à la laitière. Luquet F.M Edition Tec et Doc Lavoisier, Paris.

Gorban A.M.S. ET Izzeldin O.M., 1997. Mineral content of camel milk and colostrum. J.Dairy Techn, pp 64- 471-474.

Green L. M ; 1977. Review of the progresse of dairy science : Milk coagulation. J. Dairy. Research. Vol : 44. P159-168

Guiraud J.P., 1998. Microbiologie alimentaire, Dunod, p.390.

Guiraud J.P. ,1998. Microbiologie des principaux produits alimentaires ; in «Microbiologie Alimentaire, Techniques de Laboratoire » Dunod, Paris.

Guérard F., 1987. Une utilisation des enzymes protéolytiques extraites des viscères de poissons : La coagulation du lait. Institut pêches maritimes.49, N°.3, PP 199-203.

Guyomarc H .F., 2006. Formation of heatinduced protein aggregates in milk as a means to recover the whey protein fraction in cheese manufacture, and potential of heat-treating milk at alkaline pH values in order to keep its rennet coagulation properties. A review. Lait, 86(1) :20.

H

Havemose M.S, Weisbjerg M.R, Bredie W.L.P Et Nielsen J.H., 2004. Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. International diary journal.14, 563-570.

Haard, N.F., Shamsuzzaman, K., Brewer, P., ET Arunchalam, K., 1982. Enzymes from marine organisms as rennet substitues In : Utilisation des enzymes en technologie alimentaire. Ed., P.Dupuy**.** Technique et documentation Lavoisier p237-242.

He X., Ren Z., Guo H., Zhang W., Song X., Gan B., 2011. Purification and properties of a milk clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4.Korean J. Chem. Eng., 28(1), p.203-208.

Hardy, J., 1986. L'activité de l'eau et le salage du fromage, in : ECK, A. (Ed.), Le fromage, pp. 37-61.

Hardy J. et Scher J., 1997. Les propriétés physiques et organoleptiques du fromage. 1. Propriétés physiques. Pp. 479-492. In le fromage, de la science à la'assurance qualité. (Coord. A. ECK et J.C. GUILKLIS), 3ème ed. Tec et Doc. Lavoisier, 891p.

Humme H.E., 1972. The optimum pH for the limited specific proteolysis of κ-caséine by rennin (primary phase of milk clotting). Netherlands Milk DairyJournal, 26: 180-158.

Huppertz T., Upadhyay V.K., Kelly ET Tamime A.Y., 2006. Constituents and Properties of Milk from Different Species. *Brined Cheeses.* Edited by Dr Adnan Tamime.Copyright © 2006 by Blackwell Publishing Ltd. Pp 1-34.

J

Jacob, M., Jaros, D., et Rohm, H., 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. International Journal of Dairy Technology, 64(1), 14-33.

Jeantet r., Croguennec T., Mahaut m., Schuck p., Brule g., 2008. Les produits laitiers Ed.Tec& Doc, Lavoisier, 185 p**.**

JeantetR ; 2007. Science des aliments : biochimie, microbiologie, procédés, produits. Paris, Lavoisier, 456 p**.**

Jouan P ., 2002. Lactoprotéines et lactopeptides, propriétés biologiques. Paris : INRA, 2002. 127 p.

Johnson, M. E., et Lucey, J. A., 2006. Major technological advances and trends in cheese. Journal of dairy science, 89(4), 1174-1178.

Joffin C ET Joffin J.N., 1999. Microbiologie alimentaire Collection biologique et techniques.5 èmeédition, pp : 11.

K

Kergoat, M., 2010. Approche psychosociale et différentielle des évaluations sensorielles: Intensité affective et préférences tactiles. Université Paris Ouest Nanterre La Défense. Thèse de Doctorat**.**

Khaskheli M., Arain M. A., Chaudhry S., Soomro A. H. et Qureshi T. A., 2005. Physico-chemical quality of camel milk.Journal of Agriculture and Social Sciences, (2). P. 164-166.

Références bibliographiques

Kosikowski F., 1985. Les fromages. Revue pour la science, p. 52.

Krause ., 1998. Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases : pepsinogen, progastricsin and prochymosin. Biochem. J., 335, 481-490.

Kumar A, Sharma J, Mohanty A.K, Grover. S AND Batish V.K., 2006. Purification and caractérisation of milk clotting enzyme from goat (Capra hircus). Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology, 145: 108-113.

L

Larsson KI, Andren A., 1999. Interactions between chymosin and individual or micellar caseins. International Dairy Journal, 9: 381-382**.**

Le Graet Y, Brule G. ,1993. Les équilibres minéraux du lait : influence du pH et de la force ionique. *Lait*, 73: 51-60**.**

Lenoir J., Remeuf, et Schneid N., 1985. Le lait de fromagerie. In : Eck A. et Gillis J.C. Le fromage de la science à l'assurance-qualité. 3eed. Tec. Et Doc. Lavoisier.

Lederer J., 1983. Le lait ; Encyclopedie de l'hygiene alimentaire.tom 2, 2ème édition. Paris, p132.

Linden ET Lorient., 1994. Biochimie agro-alimentaire : Valorisation alimentaire de la production agricole. Ed. Masson. Paris. Milan. Barcelon. P 141-163.

Lowry O.M., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Bio. Chem. 193: 265-275.

Lopez M.B, Lomholt S.B, Qvist K.B., 1998. Rheological properties and cutting time of rennet gels. Effects of pH and enzyme concentration. International Dairy Journa*l*, 8: 289-293.Lucey JA, Fox PF. 1993.

Luquet F.M., 1985. Laits et produits laitiers ; vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits Dela mamelle à la laiterie. Societe Scientifique d'hygiène Alimentaire. Edition : Technologieet documentation- Lavoisier. Paris, 139

M

Mahaut M., Jeantet R., Brule G., 2003. Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc Lavoisier. 194p.

Mahaut M., Jeantet R., Schuck P.et Brule G., 2000. Les produits industriels laitiers Ed Tec et Doc. – Lavoisier : pp. 26-40.

Mahaut M., Jeantet R., ET Brule G. ,2000. Initiation à la technologie Fromagère. Techniques et Documentation, Lavoisier, 2ème tirage, 194 p.

Mahaut M., Jeantet R., Brule G., 2003. Initiation à la technologie fromagère Techniques et Documentation – Lavoisier, Paris, 194 p.

Références bibliographiques

Mathieu J., 1998. Initiation à la Physico-Chimie du Lait. Tec. Doc, Ed 01, Lavoisier,Paris.

Mathieu J., 1998. Initiation à la physicochimie du lait. ED : Lavoisier. Tec et Doc. PP 01100.

Mahaut M., Jeanter R. et Brule G. ,2005. Initiation a la technologie fromagère. Tec & Doc, Paris, France. 1-21.

Majdi I A., 2009.Séminaire sur les fromages AOP et IGP .INT-Ingénieur agronomie ,88pages.

Mahaut., Jeanter. Et Brule G., 2003. Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc, Paris, France.

McMahon D J, Brown R J, Ernstrom C A., 1984. Enzymatic coagulation of milk casein micelles. Journal of Dairy Science, 67: 745-748.

Mietton B, Gaucheron F, Salaun F., 2004. Minéraux et transformations fromagères.
In Minéraux et Produits Laitiers, gaucheron F (ed). Lavoisier : Paris ; 471-563

Mietton B., Gaucheron F., AND Michel S.F., 2004. Pp 471-583. Dans minéraux et produits laitiers de GAUCHERON F. Ed. Lavoisier, Tec et Doc, Paris.905p.

Mandic Mulec, I., Stefanic, P., ET van Elsas, J. D., 2015. Ecology of bacillaceae. Microbiology spectrum.

Moulay M., 2005. Etude de la flore lactique protéolytique du lait cru de chèvre de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée Microbiologie fondamentale et appliquée Univ d'Oran Es-Sénia.

Mohamed Ahmed I. A., Babiker E. E. and Mori N. ,2010.PH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from Solanum dubiumseeds and its enzymatic action on bovine caseins.LWT - Food Science and Technology, 43: 759-764.

Mohanty A.K., Mukhopadhyay U.K., Kaushik J.K., Grover S., Batish V.K., 2003. Isolation, Purification and Characterization of Chymosin from Riverine Buffalo (Bubalbubalis). J. Dairy Res. 70: 37–43. **Mahaut M., Jeantet R., Brulée G., 2000.** Initiation à la technologie fromagère.tec et doc/ lavoisier, Paris, 200 p.

Matoub L., 2000. Essai de purification et de caractérication d'une coagulase produite par la souche locale *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33). Thése de Magis.Agro. I.N.A. El-Harrach., 91p.

Morsli A., 1996. Recherche sur les activités protéasique de l'extrait de *Cynarascolymus*, du latex de ficus carica et du pro ventricule de Gallus gallus en vue de leur utilisation en technologie fromagère.Thèse de Magis. Agro. I.N.A. El-Harrach., 181p.

N

Najera AI, de Renobales M, Barron LJR. 2003. Effects of pH, temperature, CaCl2 and enzyme concentrations on the rennet clotting properties of milk: a multifactorial study. Food Chemistry, 80: 345-352.

NF V04 206 Janvier., 1969. Lait - Détermination de l'acidité Titrable.

Nouani A.,Belhamiche N.,Slamani R., Belbraouet S.,Fazouane FandBellal M.M., 2009. Extracellular protease from Mucorpusillus: Purification and characterization Int. J. Dairy. Technol., 112.

Noor Delviliet, P. E ; Gist Brocades, N.N ET Delf, N.C.D. ,1983. Les enzymes alimentaires. Utilisation et innocuité. Microb-Alim.Nut-Vol : 1.p 1-05**.**

O

Oner M., Akar B., 1993. Separation of the proteolytic enzyme from fig tree latex and its utilisation in gaziantep cheese production. Lebnsmittet Wissenschaft and Technology, 26, 318-321.

Otani H., Iwagaki M., Hosono A., 1991. The screening of trees having milk clotting activity. Animal Science and Technology, 62, 417-423.

Otani H., Matsumori M., Hosono A., 1991. Purification and some properties of a milk clotting protease from the young seeds of Albizia julibrissin. Animal Science and Technology, 62, 424-432.

Oyeleke S. B., Auta S. H., Egwim E. C., 2010. Production and characterization of amylase produced by *Bacillus megaterium* isolated from a local yam peel dumpsite
in Minna, Niger State. J Microbiol Antimicrob.2(7): 88-92.

P

Parente, E. AND Cogan T. M. ,2004. Starter cultures : général aspects. In : Fox, P. F., Mc Sweeney P.', Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. I. Chapman and Hall, pp. 123–142.

Pires M S, Orellana G A, Gatti C A., 1999. Rennet coagulation of casein micelles andheated casein micelles: action of Ca2+ and pH. Food Hydrocolloids, 13: 235-238.

Pinches ; A, Louw. M.E and Watson ; T ; G; 1985. Growth plasmid stability and alpha amylase production in batch biotechnologie letters ; Z 621- 626.

Polaina J., Maccabe A.P., 2007. Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications. Springer. Netherlands.

Priest, M. Goodfellow, L. A. Shute et R. C. W. Berkeley; 1987 .*Bacillus amyloliquefaciens* nov. nom. Rev. », International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 37, no 1, janvier.

R

Rao K., Mathur D, K., 1976. Studies on the production of bacterial rennet in pilot plant fermentor. Biotech and Bioeng, 17, p.1349-1351.

Ramet, J.P., 1997. Les agents de transformation du lait ; la présure et les enzymes coagulantes In : Le fromage. Ed., A. Eck, 3ème ed, Technique et documentation Lavoisier, p.101-107, 539p.

Ramet J.P., 1985. La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéens. Ed. Etude FAO. Production et santé animale, 187 P.

Riaz A.N, Haq I AND Qadeer, M A., 2003. Int. J. Agri. Biol, 5 () : 23- 28.

Roudot A.C., 2002. Rhéologie et analyse de texture des aliments. Edition, Tec et Doc., 197p.

Roupas P., 2001. On-farm practices and post farmgate processing parameters affecting composition of milk for cheese making. The Australian Journal of Dairy Technology 56(3) : 219-232.

Roseiro L.B., Barbosa M., M Ames J., Wilbey R.A., 2003. Cheese making with vegetable coagulants the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. International Journal of Dairy Technology, 56, 76-85.

S

Salghi R., 2005. Analyses Physicochimiques des denrées alimentaires.ED Nationale des Sciences Appliquées Agadir. P.16-20.

Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A., 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation. Proc. Biochem., 40 ; 2689–2694.

Settanni, L. AND Moschetti, G., 2010.Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits', Food Microbiology, p. 691–697. doi : 10.1016/j.fm.2010.05.023.

Schwimmer S AND Balls A.K. ; 1949. Isolation and properties of crystalline α-amylase from germinated barley. J. Biol. Chem. 179, p : 1063-1074.

Shieh CJ., Phan Thi LA., Shih I.L ., 2009.Milk-clotting enzymes produced by culture of Bacillus subtilisnatto. Biochem. Eng.Journal43 :85-91.

Siboukeur O., Mati A., Hessas B., 2005. Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait camelien (*camelus dromedarus*). Utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastrique de dromadaire. Cahier d'études et de recherches francophones / Agriculture.14 : 473-483.

Simon. D ET Tirard Collet .J., 2002 . Transformation des produits laitiers frais à la ferme.

Sidrach., 2005. Advences in the study of proteolysis during cheese ripening International DairyJournal11 :327-345.

Simöes I., Faro C., 2004. Structure and Function of Plant Aspartic Proteinases.*Eur. J. Biochem.* 271: 206–207.

ST Gelais D., Tirard Collet P., 2002. Fromage. Dans : Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses internationales Polytechnique, Montréal, 349-415.

Sousa M.J., Malcata F.X., 2002. Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. Le Lait, 82,151–170.

Sbodio O. A., Tercero, E. J., Coutaz V. R., Luna J. A., Martinez E., 1997. Simultaneous interaction of pH, CaCl2 addition, temperature and enzyme concentration on milk coagulation properties/Interacción simultáneadel pH, CaCl 2 añadido, temperatura y concentración enzimática sobre la coagulación de la leche. Food science and technology international, 3(4), p.291-298.

Shieh C. J., Thi L. A. P., Shih L. 2009. Milk-clotting enzymes produced by culture of Bacillus subtilisnatto. Biochemical Engineering Journal, 43(1), p.85-91.

T

Talantikite-Kellil S., Nouani A., Saunier M., Gillmann L., Brahmi A., Fazouane F.,2012. Isolation and identification of bacterial strain I33M producing milk-clotting enzyme: Optimization of culture parameters using response surface. African Journal of Biotechnology, 11(100), p.16594-16606.

V

Van Hooydonk A C M, Walstra P., 1987. Interpretation of the kinetics of The renneting reaction in milk. Netherlands Milk Dairy Journal, 41: 19-47.

Veisseyre R., 1979. Technologie du lait. Maison rustique, 3ème édition, refondue de techniques laitières, 715 p.

Veisseyre R., 1975. Technologie du lait. 3ème édition. La Maison Rustique, Paris, 713 p.

Vignola C.L., 2002. Science et technologie du lait, transformation du lait. Presses Internationales polytechnique, Québec; 608p.

Vierling., 2003. Aliments et boissons Filière et produits Doin éditeurs Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.

Vignola C.L., 2002. Science et technologie du lait, transformation du lait. Presses Internationales polytechnique, Québec ; 608p.

Visser S, Van Rooyen P.J, Slangen C.J., 1980. Peptide substrates for chymosin (rennin). Isolation and substrate behaviour of two tryptic fragments of bovine κ-casein.

Vliet T.V, Lakemond C.M.M AND Visschers R.W., 2004. Rheology and Structure of milk. protein gel. Current opinion in Colloid & Interface Science, 9: 298-304. Walstra P and Jenness R. 1992. Casein.

W

Walstra P AND Jenness R. ,1992. Casein micelles. In Dairy Chemistry andPhysics. John: New York; 229–253.

Walstra P., 1999. Casein submicelles: do they exist. International Dairy Journal 9 :189-192.

Wahba, A. ET El-Abassy.F., 1989. Bittemess in Rascheese made with soluble and Immobilized calf rennetand. Mucor Meithei. Egyptian.J.dairy. Sciences.vol: 17. P 207- 211.

Y

Yagil R., 1982. Camels and Camel Milk. FAO, Animal Production and Health, Paper N°.

Yegin, S., et Dekker, P., 2013. Progress in the field of aspartic proteinases in cheese Manu facturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. Dairy science et technology, *93*(6), 565-594.

Yıldız ., 2010. Developpement and manufacture of yougurt and other dairy products, CRC Press Taylor & Francis Group, USA.

Z

Zbikowska A, Szerszunowicz I, Smyk B., 2004. Effect of pH on the composition and surface hydrophobicity of proteins forming the gel matrix during enzymatic coagulation of heated milk reconstituted from nonfat dry milk. Milchwissenschaf*t*, 59(7/8) : 417-420

Zoon P, Van Vliet T, Walstra P., 1988. Rheological properties of rennet- induced

Skim milk-gels. 1. Introduction. Netherlands Milk and Dairy Journal, 42: 249-269.

Zikiou A., 2013. La coagulation du lait par l'extrait des fleurs de cardon (Cynaracardunculus). Thèse de Magister. Institut de la Nutrition, de l'alimentation Et des technologies agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A.). Constantine, Algérie, 86 p.

.

Annexes

Les annexes

- **Annexe 01**

Protocole de l'activité coagulante : Berridge (1945) modifiée par collin *et al*

Substrat

(Lait écrémé en poudre lowheat 12 ± 0.02 g dissout dans 100 ml d'une solution aqueuse $CaCl_2$ à 0.01M)(1977).

⇩

Agitation

⇩

Repos (60 mn à température ambiante)

⇩

Répartition (10 ml par tube à essai)

⇩

Incubation (à 30°C au bain marie/ 15 mn)

⇩

Addition de l'enzyme (à raison de 1 ml)

⇩

Homogénéisation (Immédiate par agitation manuelle rapide)

⇩

Trois retournements successifs après 30 Secondes de temps zéro

⇩

L'observation de l'apparition des flocons correspond au temps De coagulation

- **Annexe 02**

Dosage des protéines totales (Lowry &*al, 1951*)

1. Solutions :

-Solution A

Na2CO3…….…….....5g

Eau distillée……...100 ml

-Solution B

Cu SO4, 5 H2O ……...…… 0.5 g

Tartrate double de Na et K ……... ……1 g

Eau distillée ……. 100 ml

-Solution C

50 ml de la solution A + 2 ml de la solution B à préparer immédiatement.

-Solution D

NaOH (1 N) ……. 4 g

Eau distillée …….. 1000 ml

- **Solution E**

Réactif de Folin-Ciocalteau dilué ½

Mode opératoire

- Courbe étalon.
- Solution mère : BSA à raison de 200µg/ml dans l'eau distillée.
- Solution étalon : A partir de la solution de sérum albumine bovine (BSA) mère à 200µg/ml, préparer des dilutions de concentrations croissantes : 25, 50, 75, 150, 200µg/ml.
- Le tube témoin contient 0,5 ml d'eau distillée.
- Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de la solution (D) puis 2,5ml de la solution (C).
- Laisser reposer pendant 10 mn.
- Ajouter 0,5ml de la solution (E).
- Incuber pendant 30 mn à l'obscurité.

Une coloration bleue se développe correspondant à la réaction de cuivre.

Lecture : au spectrophotomètre à 750 nm contre un blanc.

- **Pour l'extrait enzymatique**

On introduit 0,5 ml de la solution enzymatique dans un tube à essai et on suit les mêmes étapes.

- **Expression des résultats**

Un courbe étalon est tracé en portant sur l'axe des abscisses les concentrations en BSA des dilutions préalables préparées et sur l'axe des ordonnées les DO mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration en protéines inconnue X, est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est en suite projetées sur l'axe des abscisses.

concentration en BSA µg/ml	**Do**
0	0
25	0,11
50	0,25
75	0,5
150	0,7
200	0.91

- **Annexe 03**

1. Détermination de la teneur en matière grasse du fromage (méthode acido-butyrométrique de VAN GULIK)

Mode opératoire

Trois grammes de l'échantillon sont broyés et introduits dans des godets en verre préalablement tarés.10ml de l'acide sulfurique sont ajoutés, puis le butyromètre est placé dans un bain marie à 65°C jusqu'à la dissolution totale du fromage. Le butyromètre est agité toutes les 5 minutes pendant la période de dissolution. 1ml de l'alcool iso-amylique est additionné.

Enfin on centrifuge pendant 5 minutes dans une centrifugeuse (1200 tours/min).



Butyromètre

- **Annexe 04**

Recherche et dénombrement des Staphylococcus aureus

Recherche de Staphylococcus aureus par la méthode d'enrichissement au milieu de Giolliti Cantonii

- **Préparation du milieu d'enrichissement**

Au moment de l'emploi, ouvrir aseptiquement le milieu Giolliti Cantonii pour y ajouter 15 ml d'une solution de tellurite de potassium. Mélanger soigneusement, le milieu et alors prêt à l'emploi (sa composition et donnée en annexe1).

- **Ensemencement**

  A partir de la dilution décimale retenue, porter aseptiquement 1 ml par dilution dans un tube stérile. Ajouter par la suite environ 15 ml de milieu d'enrichissement, bien mélanger, le milieu et l'inoculum.

- **Incubation**

  L'incubation se fait à 37°C pendant 48 heures.

- **Lecture**

  Seront considérés comme positifs, les tubes ayant viré noir. Pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un développement de Staphylococcus. Les tubes feront l'objet d'un isolement sur gélose Chapman préalablement fondue, coulée en boites de pétri et bien séchées. Les boites de Chapman ainsi ensemencées seront incubé à leur tour à 37 c° pendant 24 à 48 heures après ce délai, repérer les colonies suspecte à savoir, les colonies de taille moyennes, lisses, brillantes, pigmentées en jaune et pourvue d'une catalase et coagulasse.

➢ Annexe 05

Dénombrement des spores des anaérobies sulfito-réducteurs (clostridium)

- Chauffer les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} à 80°C pendant 8-10 min puis refroidir les tubes immédiatement sous l'eau de robinet afin de détruire les formes végétatives et d'activer les Spores .
- faire fondre la gélose Viande –Foie dans un bain marie à 100°C.
- Ajouter une ampoule de l'alun de fer et une ampoule de sulfite de sodium au milieu préalablement refroidi à 45°C.
- Couler 15 ml de la gélose dans les tubes contenant 1 ml d'inoculum de chaque dilution.
- Homogénéiser parfaitement, par retournement complet tout en évitant l'incorporation d'air.
- Refroidir dans un bain d'eau glacée et incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.

- **La lecture**

  Procéder à la numération des colonies entourées d'un halo noir.

- **Annexe 06**

Dénombrement des salmonelles

- **Pré-enrichissement**
  - Broyer 25 g de fromage dans 225 mL d'eau peptonée tamponnée à l'aide d'un ultra-turax désinfecté avec l'eau javellisée et rincée avec l'eau distillée stérile .
  - Incuber le mélange à 37°C pendant 18 h.
- **Enrichissement**
  - Introduire 1 mL du mélange de pré- enrichissement dans 2 tubes de SFB (Sélénite F-Broth).
  - mélanger la culture et incuber à 37°C pendant 24 h.
- **Isolement**
  - Couler le milieu SS préalablement fondu et refroidi en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.
  - Ensemencer en stries l'inoculum à partir des milieux d'enrichissement utilisés et incuber les cultures à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les salmonelles forment généralement des colonies vertes ou bleutées avec ou sans centre noir mais une confirmation biochimique est obligatoire (état frais, mobilité, coloration de Gram, ensemencement d'un tube de kligler (TSI), ensemencement d'un tube de gélose nutritive incliné,…)

- **Annexe 07**

Recherche et dénombrement des Coliformes en milieu liquide

- ✓ **La technique en milieu liquide**

fait appel a deux tests consecutifs a savoir :

- le test de presomption : réserve a la recherche des Coliformes totaux.
- le test de confirmation : appelé encore test de Mac Kenzie et réserve a la recherche des Coliformes fécaux a partir des tubes positifs du test de présomption.

❖ **Test de présomption**

Preparer dans un portoir une serie de tubes contenant le milieu selectif (VBL) araison de trois tubes par dilution.A partir des dilutions decimales 10-3 a 10-1, porter aseptiquement 1 ml dans chacundes trois tubes correspondant a une dilution donnee.Chassez le gaz present eventuellement dans les cloches de Durham et bienmelanger le milieu et l'inoculum.

- **Incubation**

  L'incubation se fait a 37°C pendant 24 a 48 heures.

- **Lecture**

  Sont considéres comme positifs les tubes présentant a la fois :

  - un dégagement gazeux (superieur au 1/10 de la hauteur de la cloche).
  - un trouble microbien accompagne d'un virage du milieu au jaune (ce qui constituele temoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).

  Ces deux caractéres etant temoins de la fermentation du lactose dans les conditionsopératoires décrites.

❖ **Test de confirmation ou test de Mac Kenzie**

Les tubes de VBL trouves positifs lors du denombrement des Coliformes totaux

feront l'objet d'un repiquage a l'aide d'une anse bouclee dans à la fois :

- un tube de VBL muni d'une cloche .
- un tube d'eau peptonee exempte d'indole.

  Chasser le gaz présent eventuellement dans les Cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.

- **Incubation**

  L'incubation se fait a 44°C pendant 24 heures.

- **Lecture**

  Sont consideres comme positifs, les tubes presentant à la fois:

- un dégagement gazeux dans les tubes de VBL.
- un anneau rouge en surface, temoin de la production d'indole par EscherichiaColi aprés adjonction de 2 a 3 gouttes du réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée exempte d'indole.

- **Annexe 08**

La Composition des milieux de culture

1. Eau peptonée tamponnée (EPT) : PH=7,2

Peptone ……20 g

Chlorure de Sodium…….. 5 g

Phosphate disodique……...9 g

Phosphate monopotassique …….1,5 g

Eau distillée ……1000 ml

2.Bouillon SFB (Sélénite F-Broth)

Digestion pancréatiques de caséine……5 g

Lactose ……..4 g

Sélénite de sodium…….4 g

Phosphate de sodium …… ……...100 g

3.Milieu SS

Peptone pancréatique de viande .....5,0 g

Extrait de viande .....5,0 g

Lactose .....10,0 g

Sels biliaires.....8,5 g

Citrate de sodium.....10,0 g

Thiosulfate de sodium.....8,5 g

4.Milieux de Culture DéshydratésGiolliti Cantonii

Composition	**(grammes/litre)**
Tryptone	10,0
Extrait de viande de bœuf	5,0
Extrait de levure	5,0
Chlorure de lithium	5,0
Mannitol	20,0
Chlorure de sodium	5,0
Glycocolle	1,2
Pyruvate de sodium	3,0
pH 6,9 ± 0,2	

➢ Annexe 09

FICHE DE DEGUSTATION

N° de l'échantillon :

Prenez-le temps dans votre dégustation afin de répondre au mieux aux questions ;

Veuillez rincer la bouche avant de passer d'un fromage à un autre.

1=mauvais, 6=excellent

Description de la pate à la coupe : (texture)

Caractère	1	2	3	4	5	6
Couleur de la pate						
Epaisseur de la pate						
Elasticité						
Homogénéité						

Description de l'odeur

- Par le nez sans mettre le produit en bouche.
- Absence d'odeur=1, forte odeur=6.

1	2	3	4	5	6

Description de la saveur

Sucré	Acide	Salé	Amère

Salinité (1=moins salé ; 6= trop salé)

1	2	3	4	5	6

Description des sensations

Doux	Piquant	Acre	Brulant

Description de la finale en bouche

Agréable	Très typique	Riche en arome	Intense en gout	Persistante	Plutôt courte	Fondant

Caractère	1	2	3	4	5	6
Dureté (1=mou, 6=friable)						
Cohésion (1=souple, 6=friable)						
Structure de la pate (onctueux, 6=granuleux)						

Avez-vous des remarques à faire au sujet de cette dégustation ?

.....

Avez –vous des remarques à faire au sujet de ce fromage ?

.....

- **Annexe 10**

Table de Kramer (1960)

Nombre de dégustateurs	Nombre de fromages dégustés										
	2	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
3				3-9	3-11	3-13	4-14	4-16	4-18	5-19	5-21
4		4-8	4-11	5-13	6-15	6-18	7-20	8-22	8-25	9-27	10-29
5		5-11	6-14	7-17	8-20	9-23	10-26	11-29	13-31	14-34	15-37
6	6-9	7-13	8-17	10-20	11-24	13-27	14-31	15-35	17-38	18-42	20-45
7	7-11	9-15	11-19	12-24	14-28	16-32	18-36	20-40	21-45	23-49	25-53
8	8-13	10-18	13-22	15-27	17-32	19-37	22-41	24-46	26-51	28-56	30-61
9	10-14	12-20	15-25	17-31	20-36	23-41	25-47	28-52	31-57	33-63	36-68
10	11-16	14-22	17-28	20-34	23-44	26-46	29-52	32-58	35-64	38-70	**41-76**
11	12-18	16-24	19-31	13-37	26-44	30-50	34-56	37-63	40-70	44-76	47-83
12	14-19	18-26	21-34	25-41	29-48	33-55	37-62	41-69	45-76	49-83	53-90
13	15-21	19-29	24-36	28-44	32-52	37-59	41-67	45-75	50-82	54-90	58-98
14	17-22	21-31	26-39	31-47	35-56	40-64	45-72	50-80	54-89	59-97	64-105
15	18-24	23-35	28-42	33-51	38-60	44-68	49-77	54-86	59-95	65-103	70-112
16	19-26	25-35	30-45	36-54	42-63	47-73	53-82	56-91	64-101	70-110	75-120
17	21-27	27-37	33-47	39-57	45-67	51-77	57-87	62-98	69-107	75-117	81-127
18	22-29	28-40	35-50	41-61	48-71	54-82	61-92	67-103	74-113	81-123	87-134

Annexe 11

Détermination des conditions optimales de l'activité coagulante

Influence du pH

pH	**Temps (s)**	**UP**
5,5	460	0.22
5,7	537	0.19
5.9	520	0.193
6.1	697	0.14
6.3	905	0.11
6.5	797	0.125
6.7	1598	0.063

Influence de la température

Température (°c)	Temps (s)	UP
30	1965	0.06
35	1087	0.09
40	563	0.18
45	420	0.24
50	220	0.45
55	98	1.02
60	109	0.92
65	59	1.7
70	56	1.8
75	47	2.13
80	46	2.17
85	46	2.17

Influence de la concentration en CaCl2

[CaCL2]	Temps (s)	UP
0.01	1265	0.08
0.02	765	0.13
0.03	487	0.2
0.04	365	0.27
0.05	322	0.31
0.06	425	0.23
0.07	198	0.5
0.08	47	2.13

- **Annexe 12**

Couleur

Panélistes	F p		F $_{EEB}$	
	score	Rang	Score	Rang
1	3	2	5	1
2	5	1	4	2
3	4	2	5	1
4	5	1.5	5	1.5
5	6	1	4	2
6	6	1	5	2
7	2	2	3	1
8	5	1.5	5	1.5
9	5	2	6	1
10	5	2	6	1
Moyenne du score	**4.6**		**4.8**	
somme des rangs		**16**		**14**

Epaisseur de la pate

Panélistes	F p		F $_{EEB}$	
	score	Rang	Score	Rang
1	5	2	6	1
2	6	1.5	6	1.5
3	5	1.5	5	1.5
4	5	2	6	1
5	5	2	6	1
6	5	2	6	1
7	6	1	5	2
8	5	1.5	5	1.5
9	5	2	6	1
10	4	2	6	1
Moyenne du score	**5.1**		**5.7**	
somme des rangs		**17.5**		**12.5**

Homogénéité

Panélistes	F p		F $_{EEB}$	
	score	Rang	Score	Rang
1	6	1.5	6	1.5
2	6	1.5	6	1.5
3	5	1.5	5	1.5
4	5	2	6	1
5	6	1	5	2
6	6	1	5	2
7	4	2	5	1
8	5	2	6	1
9	3	2	6	1
10	6	1.5	6	1.5
Moyenne du score	**5.2**		**5.6**	
somme des rangs		16		14

L'odeur

Panélistes	F p		F $_{EEB}$	
	score	Rang	Score	Rang
1	1	2	2	1
2	4	1	2	2
3	1	2	3	1
4	1	1.5	1	1.5
5	1	2	2	1
6	2	1	1	2
7	3	1.5	3	1.5
8	2	2	3	1
9	3	1.5	3	1.5
10	1	1	1	1
Moyenne du score	**1.9**		**2.2**	
somme des rangs		**15.5**		**13.5**

La salinité

Panélistes	F p		F $_{EEB}$	
	score	Rang	Score	Rang
1	3	2	2	1
2	4	1.5	4	1.5
3	2	1	3	2
4	5	1.5	5	1.5
5	4	1.5	4	1.5
6	3	2	2	1
7	5	1.5	5	1.5
8	1	1.5	1	1.5
9	3	2	2	1
10	3	2	2	1
Moyenne du score	**3.3**		**3**	
somme des rangs		**16.5**		**13.5**

La dureté

Panélistes	F p		F_{EEB}	
	score	Rang	Score	Rang
1	5	2	6	1
2	2	2	5	1
3	3	2	4	1
4	4	1.5	4	1.5
5	5	1	3	2
6	2	2	6	1
7	3	1	2	2
8	4	2	5	1
9	5	1.5	5	1.5
10	4	1.5	4	1.5
Moyenne du score	**3.7**		**4.4**	
somme des rangs		**16.5**		**13**