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 : Biotechnologie et microbiologie appliquée

Par :

BOUCHAABA Youcef

YAICHE Abd elhamid

Thème :

Etude des propriétés physicochimiques et sensorielles d'un fromage fait à base d'une présure de remplacement de *Bacillus amyloliquefaciens*

Soutenue publiquement le : 15/06 /2017. Devant le jury composé de :

Mr CHAOUCH Abd elrazak	MCB	Université de Médéa	Président
Mr ACHEK Rachid	MAA	Université de Médéa	Examinateur
Mr BOUBAKRI Kamel	MAB	Université de Médéa	Examinateur
Mme BOUMEDIENE Farida	MAB	Université de Médéa	Encadreur

Année universitaire 2016/2017

Résumé

Résumé

La présente étude a porté sur l'évaluation des potentialités coagulantes et protéolytiques d'une protéase, produite par la culture d'une souche isolée localement, *Bacillus amyloliquefaciens.*

L'extrait enzymatique brut obtenu à partir de la souche est caractérisé par une activité coagulante de 0.22 Up, avec une activité protéolytique de 0.496 DO660, un indice AC/AP de 104,8 et une force de 1/52. Celle-ci est optimale à une température de 80°C, une concentration en $CaCl_2$ de 0,08M et un pH de 5,5.

Ainsi, des essais de fabrication de deux types de fromage a été élaboré avec l'extrait enzymatique brut (EEB) de *Bacillus amyloliquefaciens* et la présure commerciale.

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 .Par ailleurs, L'évaluation sensorielle des deux fromages a révélé une texture et couleur satisfaisante pour chaque fromage. Cependant, la salinité des deux fromages est moins appréciée par les panélistes.

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

Summary

The present study focused on the evaluation of the coagulant and proteolytic potential of a protease, produced by the culture of a locally isolated strain, *Bacillus amyloliquefaciens.*

The crude enzymatic extract obtained from the strain is characterized by a coagulating activity of 0.22 up, with a proteolytic activity of 0.496 OD 660, an AC / AP of 104.8 and a force of 1/52. This is optimal at a temperature of 80 ° C, a $CaCl_2$ concentration of 0.08 M and a pH of 5.5.

Thus, manufacturing trials of two types of cheese were prepared with the raw enzymatic extract (EEB) of Bacillus amyloliquefaciens and the commercial rennet.

The Results of cheese yield show that cheese made from EEB is better than cheese made from industrial rennet In addition, the sensory evaluation of the two cheeses revealed a satisfactory texture and color for each cheese. However, the salinity of the two cheeses is less appreciated by the panelists.

***Key words*:** microbial protease, rennet, coagulation, Cheese, *Bacillus amyloliquefaciens*

ملخص

ركزت هذه الدراسة على تقييم إمكانية التخثر و تفكيك البروتينات من طرف البروتياز المحصل عليه من زراعة سلالة *Bacillus amyloliquefaciens* المعزولة محليا .

يتميز مستخلص الإنزيم الخام المحصل عليه من السلالة بنشاط تخثر 0,22 UP مع نشاط تفكيك البروتينات 0,496 عند DO 660 nm ومؤشر AC/AP 104,8 وقوة تخثر 52 /1 . هذه القوة تكون مثالية عند درجة حرارة 80 م° وتركيز 0,08 مول و pH عند 5,5 .

وبالتالي فقد كانت هنالك محاولات لإنتاج نوعين من الجبن الأول باستخدام مستخلص الإنزيم الخام ل *Bacillus amyloliquefaciens* والثاني باستخدام النفحة التجارية.

أظهرت نتائج مرد ودية الجبن, أن الجبن المصنوع من خلاصة الأنزيم أفضل من الجبن المصنوع من النفحة الصناعية.

وعلاوة على ذلك، أظهر التقييم الحسي لكلا النوعين من الجبن أن اللون والبنية مقبولان, بالمقابل نتائج الملوحة لم تلقى استحسانا من قبل اللجنة.

الكلمات المفتاحية : البروتياز الميكروبي، الحفنة , التخثر, الجب,***Bacillus amyloliquefaciens.***

Remerciement

On s'exprime toute nos gratitude et nos sincères remerciements à notre promotrice, Mme BOUMEDIENE Farida, d'avoir nous encadrer durant ce travail, ses conseils et orientations ainsi que pour l'encouragement qu'elle nous a donnée tout au long de réalisation de ce travail.

On tient à remercier les membres de jury : Mr CHAOUCH Abd elrazak qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Mr ACHEK Rachid et Mr BOUBEKRI Kamel, qu'ont accepté de juger ce travail.

On s'adresse nos s'incère remercîment aux personnes de la laiterie TOMLAIT pour avoir nous bien accueillir et contribuer à la réalisation de notre travail, nos chaleureux remerciements va au chef de production Mr Mohamed pour son aide et ses conseils.

Nos vifs remerciement vont à nos amis et nos collègues pour leur collaboration ainsi leur soutient morale.

Dédicace

Avant tout, je remercie le grand dieu qui nous a aidés à élaborer ce modeste travail.

Je dédie ce modeste travail

À mes très chers parents qui m'ont guidé durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, ma mère qui a été à mes côtés et ma soutenu durant toute ma vie, et mon père qui a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis.

À touts mes frères et mes sœurs qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager.

À tous mes amis, pour notre amitié et tous les bons moments passés et à venir, pour votre présence, vos bons conseils et nos fous rires partagés, un très grand merci à tous et à toutes.

À tous ceux qui m'ont aidé lors de la réalisation de ce travail, merci à tous.

Abd elhamid.

Dédicace

Je dédie ce travail

À ma très chère mère "Bensalem Safia" pour tous ses sacrifices et ses soucis pour les besoins de nos études,

À mon chère père "Rabah" qui faisait toujours l'impossible pour qu'on peut continuer nos études,

À mes frères Mohamed, Amine et Salim,

À tous qui me connait chaqu'un avec son nom

À tous mes amis et mes collègues avec les quels j'ai passé des bons moments à l'université du Yahia Fares.

Youcef

ABREVIATIONS

AC : Activité coagulante

AP : Activité protéolytique

aW: watter activity

BSA: Bovine sérum albumine

CCS: Comptage des cellules somatiques

CMP: Caséinomacropeptide

°D: Degré Dornic

Da: Dalton

E C: Enzyme Commission numbers

EEB: Extrait enzymatique brute

Eh: Potentiel d'oxido-reduction

ESD: Extrait sec dégraisse

EST: Extrait sec total

FAO: Food and Agricultural Organization

FDA: Food and Drug Administration

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

F_{P} : Fromage fait à base de la présure

FPC: Fermentation produced chymosin

GRAS : Considéré généralement comme sur

kDa: Kilo Dalton

MCA: Milk clotting activity**.**

MCE: Milk-clotting enzymes

MET: Méthionine

MG : Matière grasse

MS : Moyenne des scores

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PHE: Phenilalanine

SR: Somme des rangs.

TCA: Acide trichloracétique

UP: Unite pressure

US: Unite Soxhlet

V/V: Volume/volume

Liste des figures

Figure 1 : Modèle de micelle de caséine avec sous-unités……..……15

Figure 2 : Phases de coagulation de lait et formation de réseau……...…..….20

Figure 3: Étapes générales pour la fabrication de fromages à pâte dure…….....22

Figure 4: Séparation du lait dans le fromage et le lactosérum…….....24

Figure 5 : La diversité des fabrications fromagères……...……..…26

Figure 6 : courbe d'absorbance de différents Mc Farland à 600 nm……...28

Figure 7 : Protocole d'obtention de l'extrait enzymatique brut produit par la souche *Bacillus amyloliquefaciens*……..29

Figure 8 : diagramme de la fabrication de fromage……....….36

Figure 9 : Caractère apparent de l'extrait enzymatique……...40

Figure 10 : courbe étalon de sérum d'albumine bovin (BSA)…… ;……...42

Figure 11 : effet du pH sur l'activité coagulante de l'EEB…….43

Figure 12 : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'EEB…….44

Figure 13: Influence de $CaCl_2$ du lait sur l'activité coagulante d'EEB……...…45

Figure 14: Variation des principaux paramètres physicochimiques des deux types de fromage…….47

Figure 15 : Rendements fromagers des différents échantillons de fromage……48

Figure 16 : Fromage fait à base d'EEB…… ..…….49

Figure 17: Fromage fait à base de la présure……...49

Figure 18: Histogramme des résultats des analyses de la salinité des fromages fabriqués…50

Figure 19: Histogramme des résultats des analyses de la dureté des fromages fabriqués…..51

Figure 20: Histogramme des résultats des analyses de l'épaisseur de la pâte des fromages fabriqués……51

Figure 21: Histogramme des résultats des analyses de la couleur des fromages fabriqués…52

Figure 22: Histogramme des résultats des analyses de l'odeur des fromages fabriqués……52

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition générale du lait en g / 100 ml…….…….….13

Tableau 2 : absorbance des différents McFarland Standard à 600 nm……27

Tableau 3: activité coagulante de l'extrait enzymatique brut **…….……**40

Tableau 4: Comparaison de l'AC de l'EEB aux autre AC des coagulases ……....41

Tableau 5 : activité protéolytique et rapport AC/AP de l'EEB……..……...…….…….42

Tableau 6: Composition physico-chimique du lait utilisé dans la fabrication du fromage ……...…….…**.....**46

Tableau 7 : Composition physicochimique et rendements fromagers des fromages obtenus.47

Tableau 8: Tableau récapitulatif des résultats de test de dégustations obtenus sur les fromages élaborés……**...**….….50

Résumé

Sommaire

INTRODUCTION **1**

Chapitre 1- SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La présure et succédanés ……... 3
I.1. la présure……. 4
I.1.1. définition de la présure…… 4
I.1.2. la préparation physicochimique de la présure……. 4
I.1.3 Propriétés physicochimiques de la présure…….. 5
I.1.4 Mode d'action de la présure…… 5
I.2. Les succédanés de présure …… 6
I.2.1. Enzymes coagulantes d'origine animale…….. 7
I.2.2. Enzymes coagulantes d'origine végétale…….. 8
I.2.3. Enzymes d'origine microbienne……. 8
I.2.3.1. Enzymes d'origine fongique…… 8
I.2.3.2. Enzyme d'origine bactérienne……. 9
I.2.4 La chymosine produite par le génie génétique…… 11
II. Le lait…… 13
II.1. Définition du lait……. 13
II.2. La composition du lait……. 13
II.2.1 La fraction protéique……... 13
II.2.2 La matière grasse……. 15
II.2.3 Les Glucides…… 16
II.2.4 Les sels minéraux…… 16
II.2.5 Les vitamines…….. 16
II.2.6 L'eau……... 17
III. Le fromage……... 18
III.1. Définition du fromage……. 18
III.2. Les étapes de fabrication du fromage……. 19
III.2.1. Préparation du lait……. 19

III.2.2. La coagulation…….. 19
III.2.2.1. La coagulation acide…….. 20
III.2.2.2. La coagulation enzymatique……. 20
III.2.2.3. Coagulation mixte……. 21
III.2.3. Égouttage……. 23
III.2.4. Salage…… 24
III.2.5. Affinage……... 25
III.3. Classification des fromages…… 26

Chapitre 2-MATERIEL ET METHODES

I. L'origine de la souche……. 27
I.1 Préparation de l'inoculum…….. 27
I.2 méthode de préparation et inoculation du milieu de culture……... 28
II. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut (EEB)…….. 29
II.1 Extraction de l'enzyme coagulante…… 29
II.2 Concentration d'EEB…… 30
II.2.1 préparation des boudins de concentration…….. 30
II.2.2 la concentration d'EEB……... 30
II.3 Mesure des activités enzymatiques……... 30
II.3.1 Mesure de l'activité coagulante (AC)……... 30
II.3.2 Mesure de l'activité protéolytique (AP)……. 31
II.3.3 Détermination de l'indice AC/AP……. 31
II.3.4 Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique…….. 32
II.3.5 Détermination des conditions optimales de l'activité coagulante…….. 32
III. Analyses physico-chimique du lait…… 33
IV.1 Étapes de fabrication du fromage……. 34
IV.2 Analyses physico-chimique du fromage……... 37
IV.3 Détermination du rendement fromagère……... 37
IV.4 Analyses sensorielles du fromage……. 38

Chapitre 3- RESULTATS ET DISCUSSION

I. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut (EEB)…… 40
I.1. Caractère apparent de l'extrait enzymatique…….... 40
I.2. Activité coagulante de L'EEB……..……. 40
I.3. Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique……...….. 41
I.4. Activité protéolytique, indice AC/AP ……...……... 42
I.5. Les conditions optimales de l'activité coagulante……..……... 43
I.5.1 Influence du pH sur l'activité coagulante……...……. 43
I.5.2 Influence de la température sur l'activité coagulante……...…….. 44
I.5.3 Influence de la concentration en $CaCl_2$ sur l'activité coagulante…….... 45
II. Analyse physico-chimique du lait……...…… 46
III. Essai de fabrication d'un fromage à pate pressée cuite……...…… 46
III.1 Analyses physico-chimiques du fromage……..…….. 46
III.1.1 Rendement fromager……..…….. 48
III.2 Analyse sensorielle du fromage……...…… 49
Conclusion……... 55
Références bibliographiques
Annexes

INTRODUCTION

Introduction

Pendant longtemps la présure de veau, l'enzyme conventionnelle de coagulation du lait obtenu à partir du quatrième estomac de veaux de lait, est le coagulant le plus largement utilisé dans la fabrication du fromage dans le monde entier pour fabriquer la plupart des variétés de fromage.

Cependant, l'offre mondiale réduite de présure de veau et l'augmentation constante de la production et de la consommation de fromage a suscité de multiples recherches sur de nouvelles sources potentielles d'enzymes de remplacement, notamment les enzymes d'origine animale, végétale et microbienne. Toutefois, l'attention a été plus axée sur la production d'enzymes coagulantes d'origine microbienne.

D'une part, ces enzymes microbiennes peuvent être produites en quantité pratiquement illimitée sans qu'il y ait dépendance d'un approvisionnement en matière première. En effet, le microorganisme utile est cultivé sur un milieu spécifique de composition optimisée et son cycle de développement, limité à quelques jours, est rapide comparativement à celui nécessaire à la génération d'un animal ou d'une plante. Les enzymes sont extraites à partir du milieu réactionnel, puis purifiées selon des techniques bien élaborées qui garantissent une composition constante **(Talantikite, 2015).**

D'autre part, les microorganismes producteurs d'enzymes exocellulaires sont relativement simples à cultiver et de ce fait les prix de revient sont satisfaisants. Enfin, l'usage des préparations coagulantes d'origine microbienne est universel : il peut être envisagé dans les pays où des règles philosophique ou religieuse peuvent limiter l'emploi d'autres catégories de coagulants (**Cuvellier , 1993).**

Bien qu'il existe de nombreux microorganismes capables de produire des enzymes coagulantes du lait, seuls trois souches fongiques productrices de coagulases sont actuellement exploitées à l'échelle industrielle en vue de la fabrication fromagère. Il s'agit de: *Mucor miehei, Mucor pusillus* et d'*Endothia parasitica* **(Ramet, 2006)**.

Les espèces du genre *Bacillus* sont encore est toujours les usines bactériennes dominantes dans les fermentations microbiennes, certains espèces de *Bacillus* sont sur la liste 'GRAS '(considéré généralement comme sûre) de la FDA. Par ailleurs, leur capacité à produire et sécréter de grandes quantités (20-25 g/L) d'enzymes extracellulaires l'positionnée comme l'un des plus importants producteurs d'enzymes industriels (**Marcus *et al*., 2004).**

De plus, leur aptitude à la coagulation du lait est meilleure que celle d'origine végétale et moins bonne que celle des enzymes produites par les moisissures. En effet, les caillés obtenus manquent de cohésion du fait d'une trop forte activité protéolytique par comparaison à la présure animale (**Marcus *et al*., 2004)**. Par ailleurs, selon **Puhan et Irvine, (1973)** dans leur étude sur la protéase de *Bacillus subtilis* montrent qu'il y a possibilité d'aboutir à un bon rendement fromager par combinaison de l'extrait coagulant de *Bacillus subtilis* avec la présure.

C'est dans ce cadre d'investigation que nous avons entrepris l'étude d'une protéase coagulant le lait, produite par une souche bactérienne isolée localement ; la *Bacillus amyloliquefaciens.* Cela dans le but de mieux connaitre les potentialités coagulantes et protéolytiques de cette protéase, avec un rendement fromager comparable à celui obtenu par la présure. Dans cette optique, l'approche a consisté en :

- ✓ L'obtention de la coagulase par culture de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* ;
- ✓ L'évaluation de l'activité coagulante et protéolytique de l'extrait enzymatique brut ;
- ✓ L'étude de la qualité de fromages pressés à pate cuite.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La présure et succédanés

La première étape de la fabrication fromagère consiste à réaliser la coagulation en faisant appel à des préparations spécifiques contenant des enzymes coagulantes. Celles ci entrainent une protéolyse de la caséine kappa qui conduit à la déstabilisation des micelles et à la formation du gel. De nombreuses protéases sont capables de provoquer la coagulation du lait, mais toutes ne sont pas pour autant aptes à la fabrication fromagère car elles ne présentent pas les propriétés biochimiques et technologiques requises. Une condition essentielle est que l'enzyme ne possède pas une activité protéolytique trop élevée ; une trop forte activité conduit à la rupture de nombreuses liaisons peptidiques et à une solubilisation de l'ensemble des caséines qui engendrent de nombreuses difficultés pratiques :

- tension très faible du gel amenant un retard dans le travail ultérieur en coagulation et en égouttage.

- perte de matière sèche élevée dans le lactosérum, développent des propriétés organoleptiques anormales lors de l'affinage **(Ramet, 2006).**

La présure est la préparation enzymatique la plus largement utilisée en fromagerie, cependant, au cours des dernières décennies, l'offre en présure a reculé en raison des fluctuations de la disponibilité et de la qualité des caillettes dont l'approvisionnement est principalement dépendant du marché de la viande **(Ramet, 2006) .**

Actuellement, selon **Granday (2015)**, les différents succédanés de présure qui ont été envisagés dans l'emploi de fabrication fromagère, sont divisés en quatre groupes :

- Enzymes coagulantes d'origine animale ;
- Enzymes coagulantes d'origine végétale ;
- En 1970 apparition des enzymes coagulantes d'origine microbienne ;
- En1989-1990 apparitions des enzymes coagulantes d'origine microbienne génétiquement modifiés (chymosine produite par fermentation).

I.1 La présure

I.1.1 Définition de la présure

La présure de veau est la préparation coagulante traditionnelle la plus utilisée pour la coagulation du lait **(Alais, 1984 ; Wigley, 1996).** De moindres quantités sont obtenues à partir de l'estomac de chevreau et d'agneau **(Talantikite, 2015)**.

La dénomination présure est réservée à l'extrait coagulant provenant de la quatrième poche de l'estomac appelée abomasum ou caillette. Elle renferme deux enzymes actives, l'une, majeure, constituée par la chymosine (EC 3.4.23.3) et l'autre mineure constituée de pepsine bovine appelée pepsine A ou pepsine-II (EC 3.4.23.1). La présure contient aussi une autre protéase synthétisée au niveau de la caillette en faible quantité ayant des propriétés intermédiaire entre la chymosine et la pepsine. Elle est appelée gastricine (EC 3.4.23.4) ou encore pepsine B ou pepsine-I. L'extrait des caillettes est donc un mélange des trois enzymes précédentes **(Benyahia, 2013).**

I.1.2 La préparation physicochimique de la présure

L'extraction de la présure nécessite la préparation des caillettes qui doivent être collectées, nettoyées, séchées puis conservées. Au moment de leur utilisation, elles doivent être découpées en fines lanières puis macérées dans une solution de chlorure de sodium (10%) et de benzoate de sodium (1%). Après 24 h de macération, la solution est ajustée avec de l'acide benzoïque au pH 4,3 pour activer l'enzyme à une température allant de 20 à 25°C. Les macérations trop longues provoquent le passage en solution d'une plus grande quantité de protéines et l'enrichissement en germes microbiens. Afin d'éliminer les protéines inactives et les mucilages en suspension par une défécation, le bouillon est additionné de phosphate trisodique. Cette opération élimine aussi une partie des microorganismes ce qui est important dans un milieu souvent très chargé en germes. Le bouillon est laissé ensuite au repos pendant deux heures, puis le pH est remonté par l'hydroxyde de sodium jusqu'à pH 5,5-5,6. La défécation et le réajustement de pH doivent se faire sous une forte agitation. Le jus brut est alors filtré et est en général de couleur « jaune-or ». Un (1) gramme de la solution de présure (après macération de la caillette et filtration) peut coaguler de 2 à 4 litres de lait **(Benyahia, 2013).**

Dans 1 kg de l'extrait de présure, il y a environ 0,7 grammes d'enzymes actives, le reste est de l'eau et du sel et parfois du sodium benzoate (E211) utilisé comme conservateur à des proportions de 0,5 % - 1 % **(Alais, 1984).**

I.1.3 Propriétés physicochimiques de la présure

La chymosine est la protéase majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale; le complément est apporté par la pepsine. On observe les plus fortes teneurs en chymosine chez les animaux non sevrés; dès que la ration alimentaire renferme des aliments solides et que le jeune animal commence à brouter, la proportion de chymosine chute très fortement ; à l'inverse, la pepsine devient dominante et caractérise la sécrétion stomacale du mammifère adulte.les deux enzymes sont excrétées à l'état de précurseurs inactif (prochymosine et propepsine ; après hydrolyse dans le milieu acide stomacal, l'activité protéolytique est accrue considérablement **(Ramet, 2006).**

I.1.4 Mode d'action de la présure

La chymosine et la pepsine sont des holoprotéines dont le poids moléculaire est voisin de 30 000 Da. Ce sont des enzymes qui ont une double action sur la caséine. Elles ont une activité élevée et spécifique sur la caséine Kappa qui conduit à la libération du caséinomacropeptide et à la déstabilisation micellaire. Elles ont une activité faible de protéolyse générale sur les autres fractions de la caséine. Celle-ci intervient dès la mise en coagulation et se poursuit pendant l'affinage du fromage. Selon **(Talantikite, 2015),** l'activité protéolytique de la présure est fortement influencée par les facteurs de milieux en particulier le pH et par la température.

- **Influence du pH**

Le pH optimum d'activité coagulante de la présure sur le lait est voisin de 5,5. Au pH du lait frais (pH 6,65) l'activité est modérée. En fabrication fromagère, on a intérêt à acidifier légèrement le lait pour accroitre l'activité enzymatique.

- **Influence de la température**

La température optimum d'activité de la présure se situe à 40-42°C. En dessous de 20°C, l'activité devient faible. L'inactivation thermique totale de l'enzyme se produit à 65°C.

En fromagerie classique les températures du lait au moment de l'emprésurage se situent dans la fourchette 20-40°C.

- **Influence de la concentration en présure**

Il existe une règle approximative de proportionnalité entre la dose de présure et l'inverse du temps de floculation : plus la dose est forte plus le temps est court.

- **Influence de la concentration en calcium**

La présence d'ions Ca++ est indispensable au déroulement de la phase secondaire. Toute cause susceptible de faire baisser la teneur de ces ions dans le lait entrave la coagulation. Ces causes peuvent être naturelles.

Un traitement thermique sévère insolubilise le calcium : il est nécessaire de restaurer la charge en ions calciques par un apport de $CaCl_2$ lorsque ces laits sont destinés à être coagulés par la présure.

L'apport de calcium soluble modifie les équilibres salins vers les formes insolubles, l'addition de $CaCl_2$ provoque en outre une légère baisse de pH favorable à l'action présure. Ce phénomène résulte d'un échange entre ions H+ fixés sur les protéines et le calcium incorporé.

I.2 Les succédanés de présure

De nombreuses raisons on stimulées la recherche de succédanées capable de remplacer la présure et de trouver de nouvelles sources d'enzymes pour l'industrie. Selon **Boudier, (1974) ; Ramet, (1985) ; Eck *et* Gilllis, (1997) ; Kumar *et al.*, (2005),** les principales raisons sont :

A. Sociales et religieuses, où l'utilisation de la présure est interdite dans certains pays tel que l'inde ;

B. La non stabilité de la qualité et le prix élevé de la présure industriel sous l'effet de l'élevage moderne et l'augmentation de la production fromagère mondiale ;

C. économiques où la présure ne peut plus répondre à la demande croissante **;**

D. Nécessité pour l'industrie fromagère d'approvisionnement régulier en enzymes

Coagulante.

I.2.1 Enzymes coagulantes d'origine animale

L'étude comparative des activités coagulantes et protéolytiques de ces enzymes a révélée 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 potentielle utilisation 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).**

- **Pepsine bovine**

La pepsine bovine est extraite à partir des caillettes d'animaux adultes et de veaux sevrés. L'extrait brut contient un pepsinogène majoritaire et plusieurs pepsinogènes mineurs qui donnent après activation à pH 2,0 la série de pepsines correspondant **(Chow et Kassell, 1968).**

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).**

- **Pepsine porcine**

La pepsine porcine est produite à partir de la muqueuse gastrique du porc sous sa forme inactive. L'extrait brut de la pepsine contient dans la majorité de la pepsine A et des composes mineurs correspondants aux pepsines B, C, D, et à la gastricsine **(Cuvellier, 1993).**

Le principal inconvénient de la pepsine porcine comme agent coagulant du lait est le fait que son activité coagulante est fortement dépendante du pH. Aux valeurs de pH voisin de 6,5 et de température voisine de 30 °C, utilisées en fromagerie, la pepsine porcine est partiellement dénaturée et après 1 heure, seulement 50% de son activité coagulante est maintenue **(Andren, 2002).**

I.2.2 Enzymes coagulantes d'origine végétale

De très nombreuses préparation coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plante supérieures. Parmi les espèces de climat tempérés on trouve les feuilles et tiges du gaillet, les fleurs du charbon et de artichaut ; celles ci ont servi par le passé à la fabrication de fromages fermiers et peuvent encore parfois être utilisées localement .dans les régions chaudes, on exploite également à cette fin plusieurs plantes dont on extrait des principes coagulants : les ficines proviennent du latex du figuier, la papaïne est issue du papayer et la bromelaine de l'ananas **(Ramet, 2006).**

L'extrait coagulant de *cynara cardunculus* (une variété de chardon) a été largement utilisé pour la fabrication traditionnelle de fromages de brebis **(Roseiro *et al* ,2003).**

Ces diverses préparations, malgré certains usages locaux ne donnent pas des résultats très satisfaisants en comparaison avec eux de la présure **(Ramet, 2006).**

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 amertume et des défauts de texture des fromages et qui limite leur utilisation industrielle **(Simöes et Faro, 2004).**

I.2.3 Enzymes d'origine microbienne

Le développement de domaine microbiologique a permis de mieux comprendre la synthèse des enzymes chez les microorganismes, ce qui a orienté la production industrielle vers le processus fermentaire **(Sandhya *et al,* 2005).**
On distingue deux catégories de protéases microbiennes : les succédanés d'origine bactérienne et les succédanés d'origine fongique.

I.2.3.1 Enzymes d'origine fongique

Ils ont donné des résultats, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure; plusieurs préparations sont déjà commercialisées et utilisées à plus ou moins grande échelle selon les pays. Ces préparations proviennent de trois genres de moisissures : *Endothia parasitica* (E.p.), *Mucor pusillus* (M.p.), *Mucor miehei* (M.m.) **(Ramet ,1985)**. Certains chercheurs n'ont trouvé pratiquement aucune différence entre les fromages fabriqués par ces enzymes et ceux fabriqués par la présure **(Paquet, 1977).** D'autre part, une large variété de protéases sont également élaborées par les moisissures **(Rao *et al.,* 1988 et Wu *et al.,* 2006).**

Par ailleurs, Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Saccharomyces, Rhodotorula, Candida, Debaryomyces. Saccharomyces cerevisiae* par exemple, produit trois types de protéases ; une aspartyl-protéase, une sérine-protéase et une métallo-protéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages **(Kresze, 1991 ; Boiron, 1996).**

I.2.3.2 Enzyme d'origine bactérienne

Ces dernières années, les espèces de *Bacillus* jouent un rôle de plus en plus important dans la microbiologie appliquée. De nos jours, certaines espèces sont utilisées dans la production d'enzymes, d'antibiotiques, d'insecticides, de tensioactifs et de substances biochimiques fines, y compris des exhausteurs de saveur et des compléments alimentaires **(Banat *et al.*, 2000; Harwood, 1989; Pinchuk *et al.*, 2002).**

Des études ont permis de mettre en évidence les potentialités de certaines bactéries à produire des coagulases. Ce sont surtout les genres *Bacillus (Bacillus subtilis, Bacillus coagulans, Bacillus licheniformis*) et *Pseudomonas* qui ont été plus particulièrement explorés **(Green, 1977).**

- **Le genre *Bacillus***

Le genre *Bacillus* englobe des bactéries à Gram positif en forme de bâtonnets droits, généralement mobiles grâce à des cils péritriches, capables de former des endospores, aérobies ou anaérobies facultatives. Les cultures âgées peuvent apparaitre gram négatif.
Les *Bacillus* sont très répandus dans la nature surtout dans le sol ; ils font partie de la flore banale contaminant de nombreux produits alimentaires et sont souvent protéolytiques (**Talantikite, 2015).**

- ***Bacillus amyloliquefaciens***

Bacillus amyloliquefaciens est Gram-positif, catalase-positif, aérobie, en forme de tige et mobile. Il est connu pour ses propriétés cataboliques et la capacité à dégrader les macromolécules complexes. Il a été démontré que *B. amyloliquefaciens* produit un certain nombre d'enzymes, y compris une xylanase thermostable **(Breccia *et al.*, 1998)**, une α-amylase **(Chung et *al.*, 1985)**, une protéinase subtilisine **(Balaban *et al.*, 2007)** et une cellulase **(Lee *et al.*, 2008).**

Xiaoling *et al.*, (2010), ont constaté que *Bacillus amyloliquefaciens* possède un niveau élevé d'activité de coagulation du lait.

Weibing *et al.*, (2013) , ont récemment signalé plusieurs bactéries produisant une enzyme de coagulation du lait isolée du sol de pâturage des yaks dans le plateau tibétain du nord-est. Parmi ces bactéries, *B. amyloliquefaciens* D4 possédait une capacité élevée de production de présure dans le jus de son de blé.

La production d'enzyme de coagulation du lait par *B. amyloliquefaciens* a été appliquée avec succès dans la préparation du fromage. Compte tenu de ces propriétés,
B. amyloliquefaciens D4 est un producteur prometteur de présure microbienne **(Weibing et *al.*, 2013).**

- **Les protéases du genre *Bacillus***

La plupart des bacilles alkaliphiles produisent diverses enzymes alcalines, y compris des protéases, des amylases, des xylanases, des pullulanases et des cellulases **(Marcus *et al.*, 2004).**

De nombreuses espèces de *Bacillus* ont été explorées pour la production de protéases alcalines, mais la plupart des producteurs potentiels de proteases alcalines sont des souches de *B. amphibiensis B. licheniformis, B. mojavensis et B. subtilis* **(Rao *et al.*, 1998).**

Les espèces de *Bacillus* sont de grands candidats en tant qu'hôtes pour la production de protéines hétérologues en raison de leur grande capacité à sécréter des protéines dans le milieu extracellulaire. En revanche, les bactéries Gram-négatives accumulent des protéines dans le protoplasme ou l'espace périplasmique, et l'accumulation de produits peut être toxique pour l'organisme.

La production de protéines intracellulaires ajoute à la récupération des protéines et aux coûts de purification **(Marcus *et al,* 2004).**

Récemment, certaines souches non pathogènes d'espèces de *Bacillus* ont été produites avec succès par MCE **(Ahmed et Helmy, 2012; Wu *et al*, 2013; Hang *et al., 2016 ;* Samia et *al.*, 2016)** ont montré que L'enzyme brute produite par *B. stearothermophilus* a présenté une forte activité de coagulation du lait (MCA).

Les espèces de *Bacillus* produisent habituellement deux groupes de protéases, alcalines et neutres. Ces protéases ont une stabilité relativement faible en raison de la sensibilité à la chaleur. Cependant, cette propriété présente un certain avantage **(Lee *et al.*, 2002).**

Par exemple, au cours du processus d'hydrolyse des aliments, un faible degré d'hydrolyse peut être atteint par le contrôle de la température pour l'activité des enzymes **(Shahzad *et al* 2015).**

Pour produire des enzymes de protéases à faible coût à usage industriel, trouver, isoler et caractériser de nouvelles souches qui peuvent se développer sur des supports à faible coût en utilisant une source de carbone et d'azote non coûteuse est le principal objectif des recherches récentes **(Tang *et al.*, 2004).**

Bacilus subtilis est l'une des bactéries les plus utilisées et une source majeure d'enzymes amylase et protéase. Il est également utilisé dans la cuisson, le brassage, le tendrement, la synthèse des peptides, le diagnostic médical, la fabrication du fromage, utilisés dans certaines maladies inflammatoires, les lésions virulentes et la non-contraction de peau de mouton. Il a également une large application dans le processus de Bioremédiation **(Shahzad *et al* 2015).**

I.2.4 La chymosine produite par le génie génétique

La chymosine recombinante est principalement utilisée aux États-Unis, mais d'autres parties du monde montrent également une acceptation croissante. Il n'y a pas de chiffres exacts disponibles, mais **Johnson et Lucey (2006)** ont estimé que FPC comprend 70-80% du marché mondial des coagulants**.**

Les méthodes modernes du génie génétique ont permis de cloner le gène de la chymosine bovine (variant B) sur certains micro-organismes tel que *Escherichia coli K 12* **(Emtage *et al.*, 1983 ; Mohanty *et al.*, 1999),** *pichia* (*komagataella*) *pastorisis* **(Noseda *et al.*, 2013).**

La chymosine produite par fermentation est pratiquement impossible à distinguer de chymosine d'origine animale **(Mohanty *et al.*, 1999).** De plus, elle présente plusieurs avantages :

- elle a une faible activité protéolytique en raison de l'absence de pepsine ;
- elle a une activité coagulante plus prévisible ;
- elle est adapté au régime végétariens ;
- elle a acquis l'appui de certaines autorités religieuses (certifié halal et autres) **(Kumar *et al.*, 2010)**.

Selon **Van Den Brink *et al.*, (2006),** l'amélioration de la production de la chymosine par les champignons filamenteux (*Asergillus niger*) a été réalisée par glycosylation soit de la chymosine elle-même, entrainant une augmentation de plus de 100 % de rendement par apport à l'enzyme native , ou du transporteur qui a également entrainé une augmentation significative . Environ 10% de chymosine bovine produite par fermentation est glycosylée **(Jensen *et al.*, 2013).**

II. Le lait

II.1 Définition du lait

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères, comme la vache, la chèvre et la brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant. Du point du vue physicochimique, le lait est un produit très complexe. Une connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physiques et chimiques est indispensable à la compréhension des transformations du lait et des produits obtenus lors des différents traitements industriels **(Amiot *et al.*, 2002).**

II.2 La composition du lait

Le lait est un produit d'origine biologique fortement altérable par voie microbienne et par voie enzymatique. C'est un milieu multiphasique : une phase aqueuse contenant essentiellement le lactose, les minéraux ; une phase dispersée de nature lipidique (globules gras) et une phase de nature protéique (micelles de caséines). Cette composition varie selon différents facteurs liés aux animaux. Les principaux étant la race, la période de lactation, l'alimentation, la saison et l'âge **(Vignola, 2002).**

Tableau 1 : Composition générale du lait en g / 100 ml **(Vignola, 2002).**

Composants majeurs	**Valeur moyenne**
Eau	87.5
Matière grasse	3.7
Protéines	3.2
Glucides	4.6
Minéraux	0.9

II.2.1 La fraction protéique

Le lait possède globalement une très bonne valeur protéique en raison de son équilibre remarquable en acides aminés indispensables et grâce à la bonne digestibilité de ses acides aminés **(Alves De Oliveira, 2006)**. La protéine totale du lait comporte une importante teneur en lysine, si bien qu'elle est facilement dénaturée par la chaleur. La majeure partie des protéines est représentée par les caséines (à 80%) et le reste est représenté par les protéines du lactosérum (20%) **(Wattiaux, 1997).**

Les caséines sont une famille de molécules assez hétérogènes dont les caractères communs sont la précipitation à pH=4,6, donnant ainsi le caillé à l'origine du fromage, une

masse moléculaire faible comprise entre 20 et 25 kDa, ainsi qu'une séquence primaire riche en proline, acide aminé responsable de la faible proportion de structures secondaires dans ces molécules.

On distingue principalement quatre catégories de caséines (**Wattiaux, 1997):**

- les caséines α (aS1 et aS2) (12 à 14 g/L) ;

- les caséines β (6,2 à 9 g/L) ;

- les caséines κ (3,4 à 3,7 g/L) ;

- les caséines γ (1,2 à 1,8 g/L).

Elles sont complexées dans le lait avec le phosphate de calcium pour former des micelles, mesurant 0,08 à 0,12 μm **(Alais et Linden, 1994).** Les liaisons entre caséines et phosphore et calcium assurent la stabilité des micelles dans le lait à l'état liquide **(Aimutis, 2004),** mais les micelles sont facilement dégradées par toutes les enzymes protéolytiques.

Les autres protéines sont dites « solubles » : ce sont celles du lactosérum (phase aqueuse qui se sépare du caillé lors de la fabrication de fromage), à savoir (**Luquet, 1986):**

- α-lactalbumines (1,2 g/L) ;

- β-lactoglobulines (3 g/L) ;

- sérum albumines (0,4 g/L) ;

- immunoglobulines (0,7 g/L) ;

- protéases peptones (0,6 g/L).

(Boutonnier, 2008), définit les protéines du lactosérum comme protéines d'excellente valeur nutritionnelle, riches en acides aminés soufrés, en lysine et tryptophane. Elles ont de remarquables propriétés fonctionnelles mais sont sensibles à la dénaturation thermique.

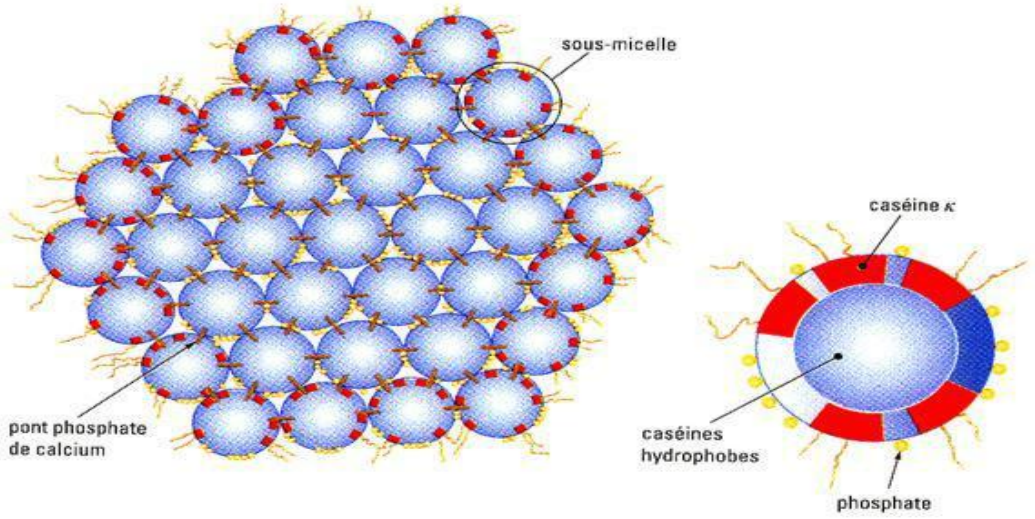


Figure 01 : Modèle de micelle de caséine avec sous-unités **(Amiot *et al.*, 2002).**

II.2.2 La matière grasse

La matière grasse ou taux butyreux représente 25 à 45 g par litre **(Luquet, 1985).** Elle est constituée par 98,5% de glycérides (esters d'acide gras et de glycérol), 1% de phospholipides polaires et 0,5% de substances liposolubles cholestérol, hydrocarbures et vitamines A, D, E, et K **(Goursaud, 1985).**

La matière grasse est dispersée en émulsion, sous forme de microgouttelettes de triglycérides entourées d'une membrane complexe, dans la phase dispersante qu'est le lait écrémé **(Boutonnier, 2008).** Cet état globulaire est fragile ; toute altération de la membrane par voie chimique, physique et microbienne conduit à la déstabilisation de l'émulsion. Cette évolution peut être accidentelle, elle se traduit alors le plus souvent par une séparation de la phase grasse sous forme d'huile ou d'agrégats et/ou par l'apparition de flaveurs indésirables (rancidité-oxydation) ; lorsqu'elle est dirigée, elle permet la concentration de la phase grasse sous forme de beurre après barattage, ou sous forme d'huile de beurre et de matière grasse laitière anhydre après chauffage et centrifugation **(Madji, 2009).**

II.2.3 Les Glucides

Le lactose, disaccharide composé de glucose et de galactose, est le sucre majoritaire du lait ainsi que le constituant essentiel de la matière sèche (**Gaiani, 2006** ; **Snappe *et al.*, 2010**). Il se retrouve sous deux formes isomères en équilibre dans le lait : le lactose hydraté ou α-lactose et le lactose anhydride ou β-lactose. Ces deux formes diffèrent par la configuration stérique de l'atome d'hydrogène et du groupe hydroxyle OH au niveau du carbone C1 du glucose. Leurs proportions relatives à température ambiante sont de 37 et de 63 % pour les formes α et β respectivement **(Gaiani, 2006).**

Le lactose joue un rôle important, lié notamment à sa valeur nutritionnelle et à sa fermentescibilité qui commande l'élaboration de divers produits laitiers (**Mahaut *et al.*, 2003).**

II.2.4 Les sels minéraux

Le lait contient également des sels minéraux à hauteur de 7 g/l environ retrouvés soit en solution dans la fraction aqueuse, soit sous forme liée dans la fraction colloïdale. Les minéraux les plus représentés en termes d'équilibre micellaire sont le calcium (1,2 g/l), le phosphore (0,9 g/l) et le citrate **(Holt, 1992).** Dans la fraction soluble, ils existent en partie sous forme libre (calcium -un tiers de la fraction totale- et magnésium ionisés), sous forme saline (phosphates et citrates non dissociés au calcium ou au magnésium), ou sous forme complexe (esters phosphoriques et phospholipidiques). Dans la fraction colloïdale, les minéraux tels que le calcium (deux tiers de la fraction totale), le phosphore (la moitié de la fraction totale), le soufre et le magnésium sont liés à la caséine au sein des micelles **(Gaucheron *et al.*, 2004)**. D'autres minéraux sont également présents dans le lait à l'état dissous sous forme d'ions tel que le sodium, le potassium et le chlore.

II.2.5 Les vitamines

Ce sont des molécules complexes de taille plus faible que les protéines, de structure très variées ayant un rapport étroit avec les enzymes, car elles jouent un rôle de coenzyme associée à une apoenzyme protéique. On classe les vitamines en deux grandes catégories :

- les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) de la phase aqueuse du lait.

- les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E, et K) associées à la matière grasse, certaines sont au centre du globule gras et d'autres à sa périphérie **(Debry, 2001).**

II.2.6 L'eau

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

- l'eau extramicellaire 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 intermicellaire 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).**

III. Le fromage

III.1 Définition du fromage

Non seulement le lait se consomme à l'état nature, il peut également subir différentes biotransformations qui contribuent à élargir considérablement ses qualités sensorielles et nutritionnelles. L'un des dérivés de ces transformations est le fromage **(Henri *et al.*, 2008).**

Le fromage est le produit affiné ou non de consistance molle, semi-dure, dure ou extra-dure obtenu par coagulation complète ou partielle de lait. Les propriétés du gel formé diffèrent selon la nature de l'agent coagulant et le type de fromage. La coagulation peut être lactique ou enzymatique **(Vignola, 2002).**

Les fromages sont des formes de conservation et de stockage ancestrales de la matière utile du lait dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont très appréciées **(Jeantet *et al,* 2008).**

Au plan technologique, le fromage est de la caséine plus ou moins débarrassée des autres constituants du lait et plus ou moins transformée. La norme **FAO/OMS n° A-6** (1978, modifiée en 1990) donne la définition suivante:

« Le fromage est le produit frais ou affiné, solide ou semi-solide, dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine n'excède pas celui du lait, obtenu:

- par coagulation du lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, crème de lactosérum ou babeurre, seul ou en combinaisons, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés, et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation;
- par l'emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation du lait et/ou des matières obtenues à partir de lait, présentant des caractères physiques, chimiques et organoleptiques similaires à ceux du produit défini plus haut.»

Selon cette même norme:

- Le fromage «affiné» est celui qui n'est pas prêt à la consommation immédiatement après la fabrication, 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.
- Le fromage «affiné aux moisissures» est celui dont l'affinage est provoqué essentiellement par la prolifération de moisissures caractéristiques dans la masse et/ou sur la surface du fromage.
- Le fromage «frais ou non affiné» est du fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après la fabrication (**FAO, 1998).**

A l'échelle mondiale, il existe environ 1000 variétés de fromages différents **(Irlinger et Mounier, 2009).**

III.2 Les étapes de fabrication du fromage

La production de toutes les variétés de fromage implique un protocole généralement similaire, dont les différentes étapes sont modifiées pour donner un produit aux caractéristiques souhaitées **(Fox *et al.*, 2017).**

La transformation de lait en fromage, comporte pour la plus part trois étapes principales qui sont la coagulation, l'égouttage et l'affinage **(Vignola, 2002). Eck**, **(1987)** a signalé le salage avant l'affinage.

Selon **Jeantet *et al.*, (2008)** la standardisation de lait précède ces étapes :

III.2.1 Préparation du lait

III.2.2 La coagulation

La coagulation correspond aux modifications physicochimiques des micelles de caséine sous l'action d'enzymes protéolytiques et/ou d'acide lactique ce qui aboutis à la formation d'un coagulum **(Eck, 1990 ; Vignola, 2002 ; Jeantet *et al.*, 2008).**

La coagulation du lait peut se faire via 3 processus :

- ✓ Par acidification
- ✓ Par voie enzymatique
- ✓ La coagulation Mixte

III.2.2.1 La coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique (pHi = 4,6) par acidification biologique à l'aide des ferments lactiques qui fermentent le lactose en acide lactique, ou par acidification chimique par injection de CO2, addition de glucono-δ-lactone ou ajout de protéines sérique à pH acide **(Mahaut *et al.*, 2003)**.

Le gel obtenu par acidification présente une bonne perméabilité mais une friabilité élevée. Le manque de structuration du réseau a pour conséquence une élasticité et une plasticité pratiquement nulle et une faible résistance aux traitements mécaniques **(Vignola, 2002; Jeantet et *al.*, 2008).**

III.2.2.2 La coagulation enzymatique

La coagulation enzymatique du lait est un processus en trois étapes qui sont : la phase primaire ou enzymatique, la phase secondaire et la phase tertiaire **(Dalgleish, 1993; Fox *et al.*, 1996; Fox et Mcsweeney, 1997 ; Mahaut *et al.*, 2003 ; Horne et Banks, 2004).**

- **Phase primaire**

Cette phase dite enzymatique, correspond à une attaque de l'enzyme sur la caséine-κ (composante qui stabilise la micelle) au niveau de la liaison PHE105-MET106. La chaine peptidique se trouve ainsi coupée en deux segments, le segment 1-105 est la paracaséine-κ et le segment 106-169 qui est le caséinomacropeptide (CMP). La paracaséine-κ liée aux caséines α et β reste intégrée à la micelle hydrophobe et le CMP contenant tous les glucides est libéré dans le lactosérum. Ce qui entraine une réduction de la charge négative et leurs degrés d'hydratation **(Lucey, 2002 ; Mahaut *et al,* 2003 ; Huppertz *et al,* 2006).**

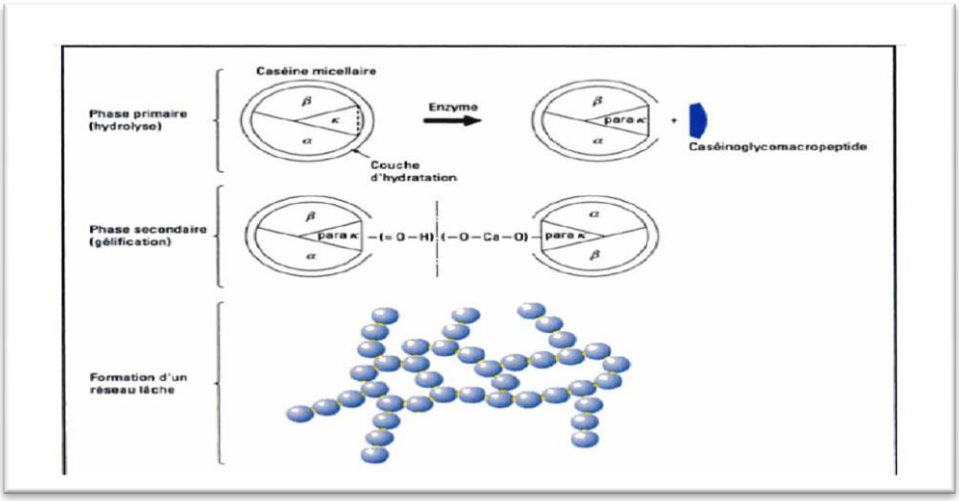


Figure 02 : Phases de coagulation de lait et formation de réseau **(Vignola, 2002).**

- **Phase secondaire**

Cette phase commence dés que 85% de la caséine-κ est hydrolysée **(Huppertz *et al.*, 2006).** Elle est dite phase d'agglomération ou d'agrégation ou phase de coagulation proprement dit **(Lucey, 2002).** Durant laquelle la libération du macropeptide de la caséine-κ sous l'action de l'enzyme entraine la réduction des répulsions électrostatiques entre les micelles de caséines hydrolysées. L'élimination de ces macropeptides entraine également une réduction du diamètre hydrodynamique et une perte de la stabilité **(Walstra et *al,* 1981 ;Lucey *et al.*, 2003).**

La nature des interactions intervenant durant cette phase n'est pas encore bien connue **(Schmidt, 1982 ; Vignola, 2002**).Toutefois, les ponts calciques et les forces de Van der Waals ainsi que les interactions hydrophobes semblent être impliquées **(Schmidt, 1982).** Les micelles déstabilisées s'agrège en présence des ions de calcium libres (Ca++) **(Lucey et Fox, 1993 ; Dalgleish et Holt, 1988).** Au début, il ya formation de chaines linaires de micelles qui continuent de s'agréger pour former des amas. Ces derniers constituent le gel protéique qui se sépare nettement de lactosérum **(Lucey, 2002).**

- **Phase tertiaire**

Durant cette phase, les micelles agrégées subissent une profonde réorganisation par la mise en place de liaisons phosphocalciques et peut être de ponts disulfures entre les para caséines **(Mahaut *et al.*, 2000; Vignola, 2002).**

III.2.2.3 Coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. La multitude de combinaisons conduisant à différents états d'équilibres spécifiques est à l'origine de la grande diversité des fromages à pâte molle et à pâte pressée non cuite **(Mahaut *et al.*, 2003).**

Le coagulum obtenu présente des caractères intermédiaires entre ceux de gel lactique et présure. Il est caractérisé par une souplesse et une élasticité moins grande, une fermeté et friabilité plus accentuées que celle du gel présure **(Veisseyre, 1975 ; Jeantet *et al.*, 2008).**

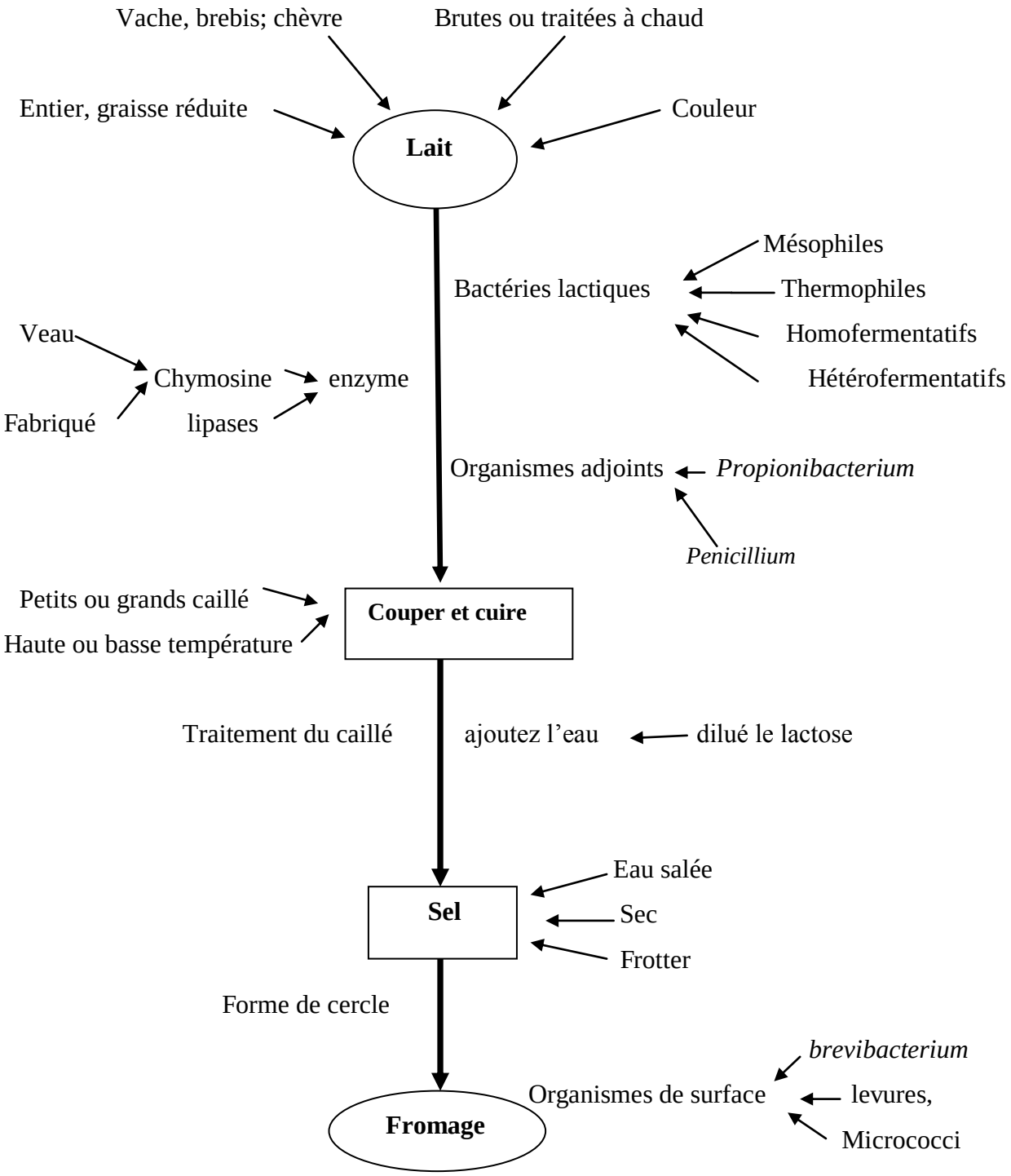


Figure 03: Étapes générales pour la fabrication de fromages à pâte dure **(Robert ,2006).**

III.2.3 Égouttage

L'égouttage est l'étape de séparation du caillé (la phase solide) et du lactosérum ou petit lait (la phase liquide) composée d'eau et de matières solubles telles que le lactose (75%), des minéraux (essentiellement du calcium), des vitamines et des protéines (10%). Durant cette phase, ce sont 80% de l'eau contenue dans le caillé qui sont éliminés **(Talantikite, 2015).**
Les pertes sont de deux natures :

- directes : chutes de caillé ou de résidus collant aux moules durant le pressage.

- indirectes : une irrégularité dans la répartition des grains (plus ou moins gros) au cours du moulage ainsi qu'une irrégularité de traitement après moulage (température, hygrométrie, pression) vont entrainer une évaporation irrégulière du sérum et accroitre les dispersions de poids et d'extrait sec de fromages vendus à la pièce. On peut chercher à détecter ces irrégularités en comparant les écarts types avant et après pressage, dans le cas de pates pressés et voir ainsi la part des différents facteurs. Il est plus délicat d'évaluer les dispersions dues respectivement au moulage et à l'égouttage des pâtes molles **(Pointurier *et al.*, 2003).**

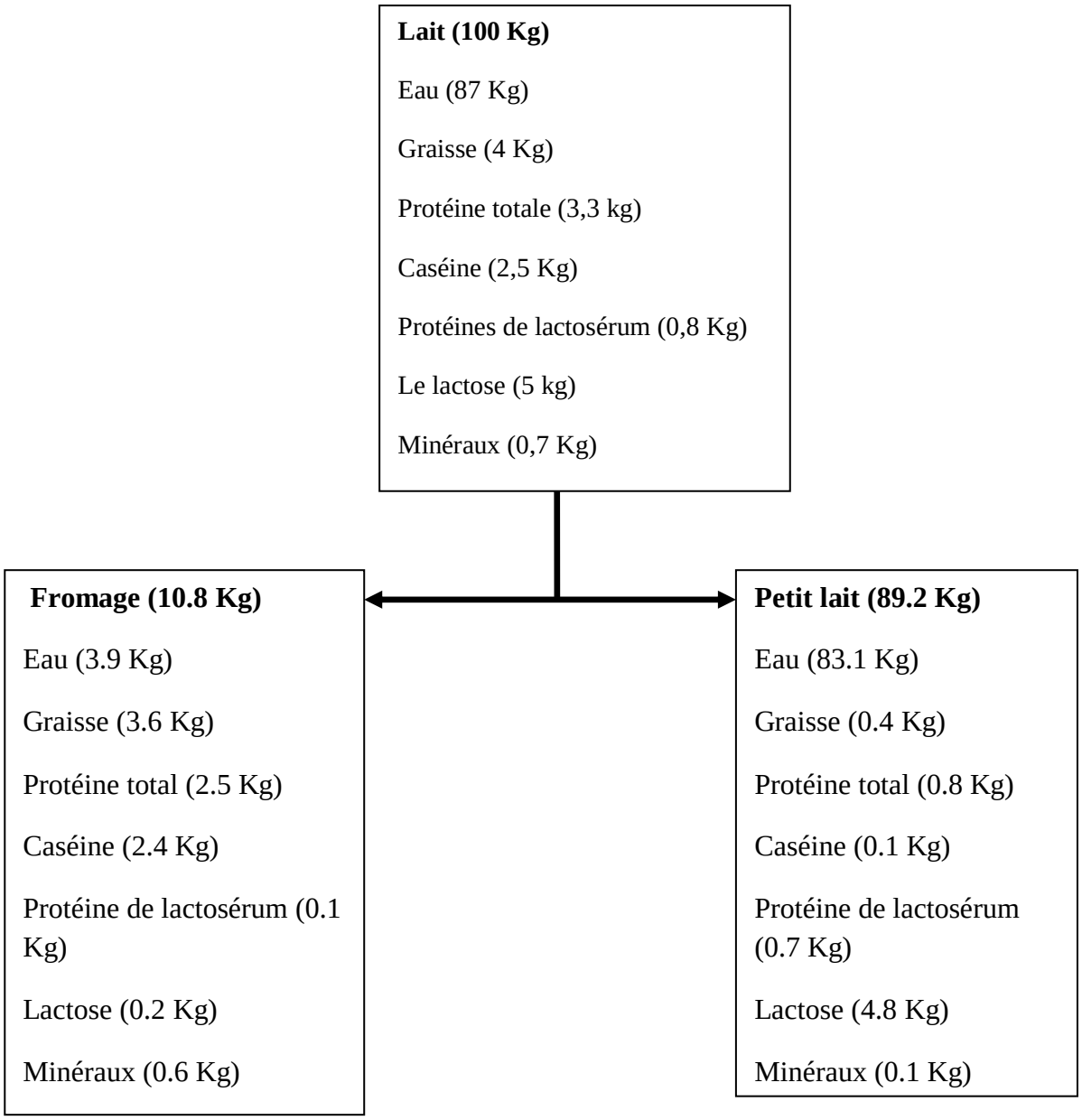


Figure 04: Séparation du lait dans le fromage et le lactosérum **(Robert ,2006).**

III.2.4 Salage

Le sel est un ingrédient essentiel qui apporte de la saveur, améliore la synérèse et contribue à la préservation de la plupart des fromages.

Le sel peut être appliqué directement (c'est-à-dire sous forme sèche) au caillé, comme dans le cas du cheddar, ou le sel peut être frotté sur la surface du fromage hooped, comme dans le cas de certaines variétés de fromage bleu (Gorgonzola et Roquefort). Alternativement, certains fromages, tels que le suisse, la mozzarella et le parmesan, peuvent être placés dans des saumures **(Robert ,2006).**

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).**

Évidemment, lorsque le salage se produit par des procédés de saumurage, la quantité de sel qui se termine dans le fromage est fonction de la vitesse de diffusion dans le fromage, ainsi que de la géométrie du bloc de fromage, de la durée du saumurage et de la saumure. Si le fromage est façonné ou coupé en petites unités et laissé dans la saumure, comme avec le fromage Feta, les concentrations de sel peuvent être très élevées (>3%). En revanche, les grands blocs ou roues de fromage suisse saumuré contiennent typiquement moins de sel (<1%), en particulier dans les sections intérieures.

Les fromages salés qui sont ensuite laissés sécher à l'air libre développent des croûtes naturelles, en raison de la déshydratation de surface **(Robert, 2006).**

III.2.5 Affinage

Le vieillissement ou la maturation est également l'une des étapes les plus complexes et les plus variables de tous les fromages. Ceci est dû en grande partie aux enzymes et aux microorganismes qui sont principalement responsables des changements de saveur et de texture qui se produisent pendant Mûrir. Les enzymes dans le fromage peuvent se trouver naturellement dans le lait ou être ajoutées directement sous forme de présure, de chymosine ou d'extraits de lipase. Les enzymes sont également dérivées de bactéries de culture initiale, d'organismes adjuvants ou d'organismes endogènes du lait.

En outre, la disponibilité des substrats et les conditions de pH et Eh dans le fromage influencent l'activité de ces enzymes et les types et quantités de produits qui sont formés. De même, les microorganismes du fromage proviennent du lait, de l'environnement et de la culture de départ. Bien que la température dans les salles de vieillissement soit généralement faible (habituellement autour de 3°C à 7°C, mais parfois beaucoup plus élevée) Particulièrement favorables à la croissance, le métabolisme des différents substrats dans le fromage par les organismes intacts se produit encore Un fromage de maturation représente un écosystème plutôt dynamique **(Robert, 2006).**

III.3 Classification des fromages

La diversité de la texture, des propriétés fonctionnelles, de la saveur et de l'arôme des nombreux fromages affinés produits dans le monde provient principalement de la différence de lait et des principaux procédés de fabrication du fromage (qui comprennent l'utilisation de différentes cultures et adjuvants) La composition du fromage, le complément enzymatique et la maturation, ainsi que les différences de température de stockage et de durée de conservation du fromage **(Coker *et al.*, 2005).**

La diversité et la complexité des fromages créent des difficultés en ce qui concerne la classification et la caractérisation des fromages. La plupart des systèmes de classification classiques reposent exclusivement sur l'un des critères suivants:

- Les propriétés de texture (fermeté), le type de lait, la méthode de coagulation, la température de cuisson, la composition du fromage et l'agent de mûrissement caractéristique.

Cependant, peu de modèles de classification sont basés sur des approches intégratives qui montrent une image plus précise de la diversité des fromages et de la différenciation entre les nombreuses variétés. En outre, une évaluation internationale des systèmes de classification par familles indique également deux approches majeures, mais différentes, qui peuvent dans certains cas être source de confusion :

- L'approche «européenne» (principalement utilisée en France et en Europe du Sud) utilise les processus technologiques comme critères de classification, tandis que le modèle de classification «anglo-saxonne» repose principalement sur les propriétés de la texture (fermeté) **(Montserrat et Bernard ,2014).**

Les différentes variétés de fromage sont bien élucidées dans le schéma si dessous :

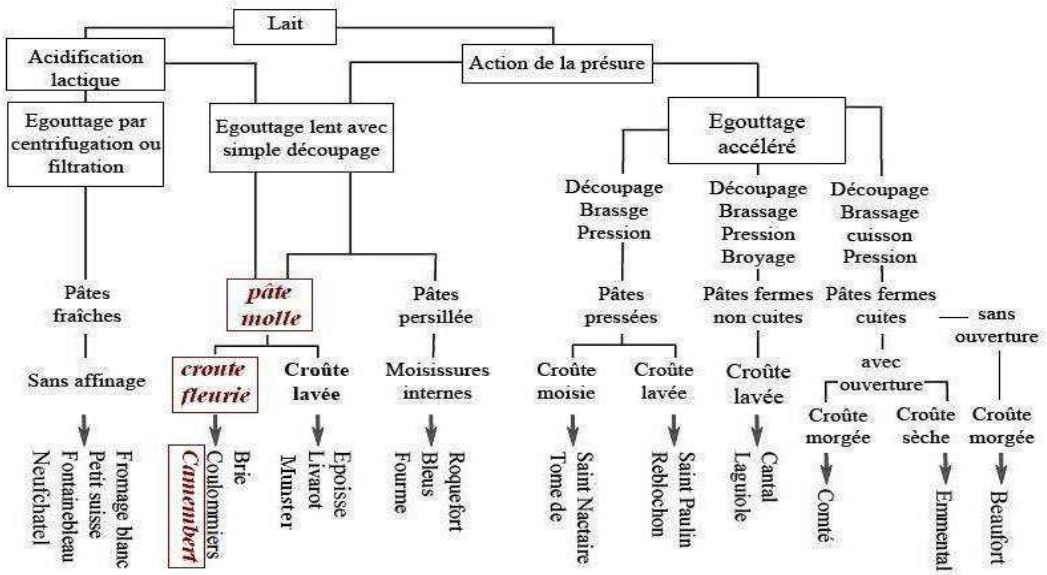


Figure 05 : La diversité des fabrications fromagères **(Lenoir *et al.*, 1985).**

MATERIEL

&

METHODES

I. Origine de la souche

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

Pour des raisons déontologie scientifique, les techniques d'isolement ne sont pas décrites dans ce présent travail.

La souche a été conservée à 4°C en tube sur gélose conservateur inclinée. Un repiquage trimestriel est nécessaire afin d'assurer la vitalité de la souche.

I.1 Préparation de l'inoculum

La souche *Bacillus amyloliquefaciens* est activée par incubation à 30°C pendant 24 heures. Puis elle est submergée de solution stérile d'eau physiologique (10 ml dans un tube à essai).

A l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose (G.N) afin de mettre en suspension les bactéries. Ensuite la suspension est ajustée au standard Mc Farland 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. Le Mc Farland 5 est équivalent à $1{,}5 \times 10^9$ UFC/ml.

Tableau 2 : Absorbance des différents McFarland 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

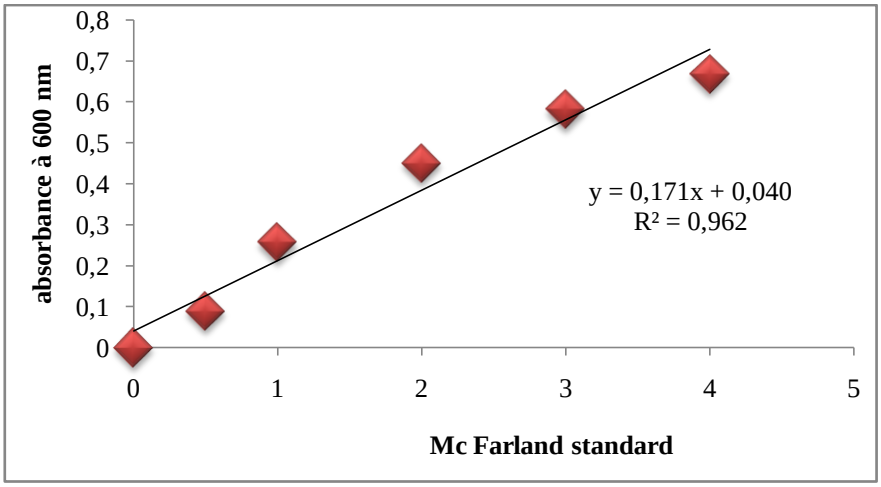


Figure 6 : Courbe d'absorbance de différents Mc Farland à 600 nm.

I.2 Méthode de préparation et inoculation du 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 $(NH_4)_2SO_4$ à 0,1% (poids/vol).

Les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé enveloppé dans un filet de gaze 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 10 ml de l'inoculum. L'incubation a lieu à 32°C pendant 24 heures.

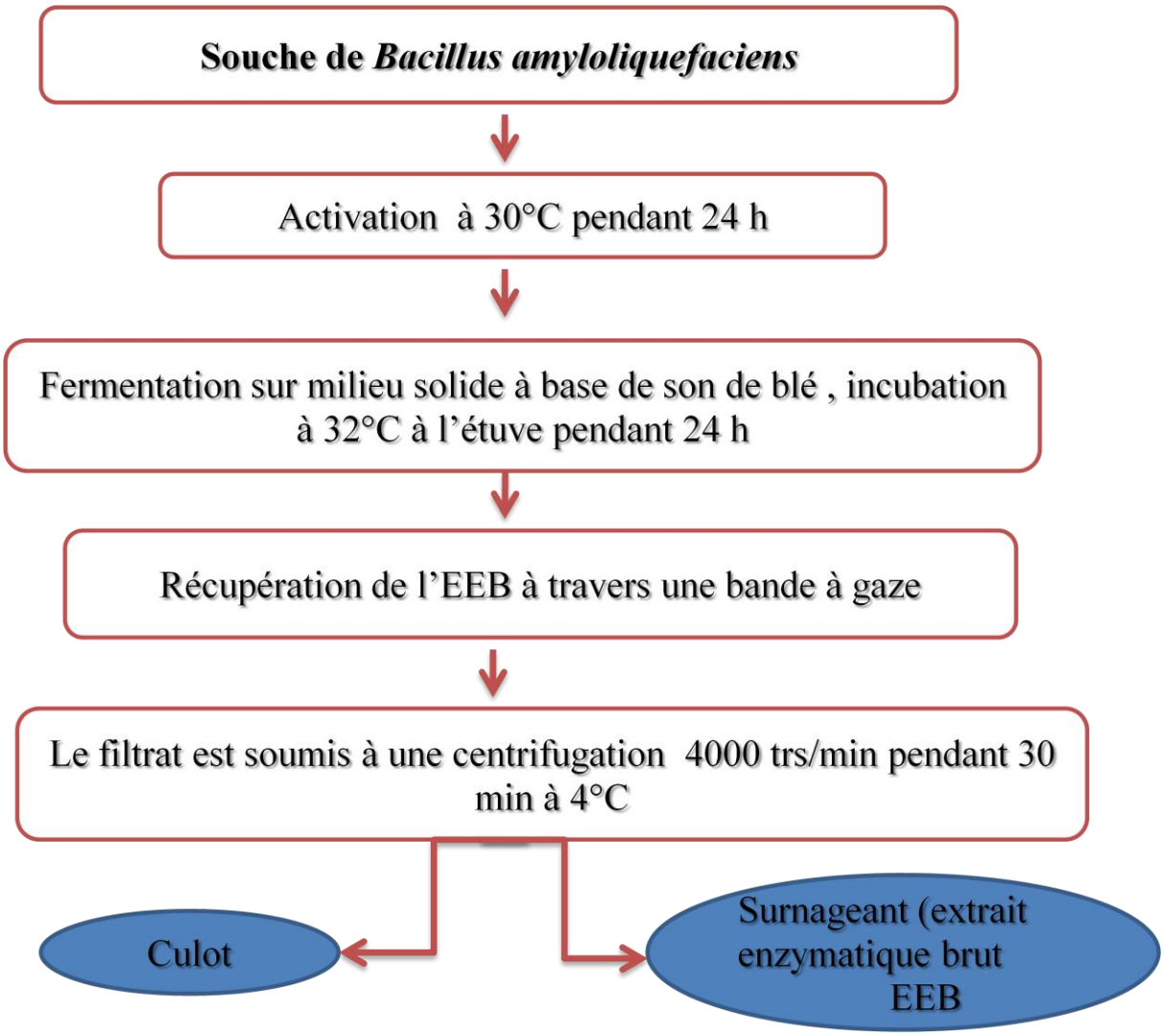


Figure 7 : Protocole d'obtention de l'extrait enzymatique brut produit par la souche *Bacillus amyloliquefaciens*

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

II.1 Extraction de l'enzyme coagulante

Pour la récupération de l'extrait enzymatique brut, on procède d'abord à une filtration du contenu des erlenmeyers incubés sur gaze dans une zone stérile, entreposée sur un entonnoir. Le filtrat est ensuite soumis à une centrifugation à 4000 trs/min pendant 30 min à 4°C (**Ding *et al.*, 2015)**. Le surnageant récupéré constitue l'extrait enzymatique brut.

II.2 Concentration de l'EEB

II.2.1 Préparation des boudins de concentration

La membrane de cellophane est placée successivement dans un mélange éthanol-eau (v /v) /1h suivi d'une solution de bicarbonate de sodium NaHCO3 (10mM / 1h), une solution diluée d'EDTA /1h et enfin dans l'eau distillée pendant 2 heures.

II.2.2 La concentration de l'EEB

La concentration de l'EEB se fait par osmose dans une solution de glucose à 60%.

II.3 Mesure des activités enzymatiques

II.3.1 Mesure de l'activité coagulante (AC)

L'activité coagulante de l'extraits enzymatique brut (EEB) ou purifié (EEP) sont déterminées selon la méthode de **Soxhlet (Tsouli, 1979)** et de **Berridge** modifiée par **(Collin *et al*., 1997).**

- **La Méthode de Soxhlet (Tsouli, 1979)**

  Cette méthode permet d'exprimer l'activité de l'extrait enzymatique en force coagulante unité de Soxhlet (Us), qui correspond au volume de lait coagulé par un volume de présure en 40 min à 35°C et à pH= 6,4 ; (substrat de Berridge, **annexe 1**).

Cette force est exprimée par :

$$F = 2400.V/t.v$$

Où :

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.

- **Méthode de Berridge modifiée par (Collin *et al*., 1997)**

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

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

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

Où :

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.

- **Test d'activité**

Un volume de 1 ml de l'extrait enzymatique est ajouté à des fractions de lait reconstitué de 10 ± 0.01 ml, qui sont distribuées dans des tubes de (18 x 180 mm) et sont ensuite placés dans un bain-marie régulé à 35 ± 0.05°C pendant 30 min.

La mesure prise pendant ce test est le temps de coagulation correspondant au temps mesuré entre l'ajout d'enzyme à 10 ml du substrat et l'instant où les premiers flocons de caillé de lait apparaissent sous forme d'un film sur la paroi du tube mis en rotation à une vitesse de 4 tours par minute.

II.3.2 Mesure de l'activité protéolytique (AP)

L'activité protéolytique est mesurée selon la méthode d'**Arima (Arima *et al.*, 1970)**. Elle permet l'évaluation du taux de dégradation du substrat (caséine) pendant la réaction primaire. Cette activité est déterminée par la mesure de la densité optique à 660 nm de la caséine hydrolysée, qui est soluble dans l'acide trichloracétique (TCA).

II.3.3 Détermination de l'indice AC/AP

Selon **(Abdel-Fattah *et al.*, 1974) et (Abdelrahman *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.3.4 Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants est réalisé selon la méthode de **Lowry (Lowry *et al* 1951).** C'est une méthode de dosage colorimétrique**,** basée sur la coloration bleue développée suite à une réaction entre les protéines et le réactif de Folin-Ciocalteau, Ce réactif permet la réduction des acides aminés aromatiques principalement la tyrosine et le tryptophane conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont on mesurera l'absorbance à 750 nm.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration protéique contenue dans les extraits. Cette concentration est déterminée à l'aide d'un courbe étalon établie en utilisant le sérum d'albumine bovin (B.S.A. à 200 µg /ml).

II.3.5 Détermination des conditions optimales de l'activité coagulante

L'activité coagulante du lait dépend fortement de plusieurs paramètres, notamment, la température, le pH, concentration en $CaCl_2$ du lait et la concentration en enzyme. La mesure de l'activité en fonction de ces différents paramètres est déterminée dans les conditions standards du substrat de Berridge (35°C, pH 6.4, $CaCl_2$à 0.01M).

L'activité coagulante est exprimée en unité de présure (UP) dont la plus forte activité est celle qui correspond au temps de coagulation le plus court.

Pour l'évaluation de l'influence des différents paramètres sur l'activité coagulante, nous avons effectué 3 mesures par essai.

- **Influence de la température**

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 pas de 5°C.

- **Influence du pH**

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 5,5 à 8 avec un pas de 0,2, en utilisant du HCl 0,1N et du NaOH 0.1N.

- **Influence de la concentration en $CaCl_2$**

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 M à 0,08M avec un pas de 0.01M.

III. Analyses physicochimiques du lait

Des analyses physicochimiques on été réalisées sur les échantillons de lait prélevés.

- **Extrait sec total, extrait sec dégraissé**

L'extrait sec total a été calculé à partir de la formule suivante :

EST= (densité -1) ×2665 + (MG×1,2)

Ou :

EST : extrait sec total

MG : matière grasse

Tandis que l'extrait sec dégraissé représente la différence entre l'extrait sec total de l'échantillon et sa teneur en matière grasse:

ESD = EST- MG

- **pH initial**

Le pH et l'acidité sont des indicateurs de la qualité hygiénique et bactériologique de lait. Il est basé sur la lecture directe du pH indiqué sur l'écran en introduisant l'électrode d'un pH-mètre (étalonné avec des solutions tampon) dans un bécher contenant le lait qui doit avoir une température de 20°C.

- **Détermination de l'acidité titrable du lait**

Basé sur la réaction de neutralisation de l'acidité lactique par la soude Dornic (NaOH N/9) en présence d'un indicateur coloré qui est la phénolphtaléine (virage entre 8,3 à 8,6)

L'acidité est donnée par la lecture directe de la chute de la beurette, elle est exprimée en degré Dornic (°D) avec 0,1ml de NaOH correspond à 1°D.

- ✓ **Expression de résultat**

AT= V*10(°D)

AT = Acidité titrable.

V= Le volume en ml correspond à la chute de la burette.

La valeur de l'acidité est exprimée en degré Dornic.

- **Densité**

La densité du lait se définit comme étant le quotient de la masse d'un volume de lait sur le même volume d'eau. La mesure de la densité du lait s'obtient par lecture directe à l'aide d'un appareil appelé « lactodensimètre ».

- **Teneur en matière grasse**

Le dosage de la matière grasse s'effectuera selon la méthode conventionnelle de Gerber (AFNOR 1986, norme NF-V04-210) **(Annexe 3).** Cette méthode est basée la dissolution des éléments du produit à doser exceptée la matière grasse et ceci par l'acide sulfurique. Par la suite, cette matière grasse va se séparer en couche claire sous l'influence de force centrifuge et grâce à l'adjonction d'une faible quantité d'alcool iso-amylique.

L'application de cette méthode sur un lait à une température de 20°C donne une teneur en matière grasse exprimée en 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 fromagère a pour but principal l'étude des aptitudes à la coagulation du lait de l'enzyme extraite à partir de la souche microbienne en comparaison avec la présure commerciale. Cet essai a été effectué au sein 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 4 L issu d'une laitier TOMLAIT 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**

La préparation du lait consiste à la pasteurisation du lait à 80°C pendant 20 secondes afin d'éliminer tous les germes pathogènes. Après refroidissement du lait à 42°C, on ajoute 2.5 g de CaCl2 et 2 g de yaourt afin d'ensemencer le milieu avec les ferments lactique (mésophiles) plus précisément *Streptococcus thermophilus* qui intervient dans l'affinage des fromages à pâte pressée et d'amener le lait a son pH d'emprésurage, et enfin la maturation des ferments à 42°C pendant 1h.

- **Emprésurage**

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 présure : 1/120 ⟶ Dose 0,016 g /2L

Force EEB : 1/52 ⟶ Dose 38 ml /2L

- **Découpages, brassage et lavage du caillé**

Cette étape consiste à découper le caillé en petits cubes réguliers puis brasser avec une louche afin d'éviter la soudure des grains de caillé et accentuer leurs assèchement. Ensuite vient l'étape de lavage du caillé qui consiste à remplacer une partie du sérum par de l'eau pour abaisser la richesse du caillé en lactose afin d'éviter une sur acidification (réduire l'acidité par l'ajout de l'eau).

- **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.

- **Prépressage, 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.

- **Saumurage**

Une fois pressées, 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 en freinant le développement des microorganismes et en régulant les activités enzymatiques.

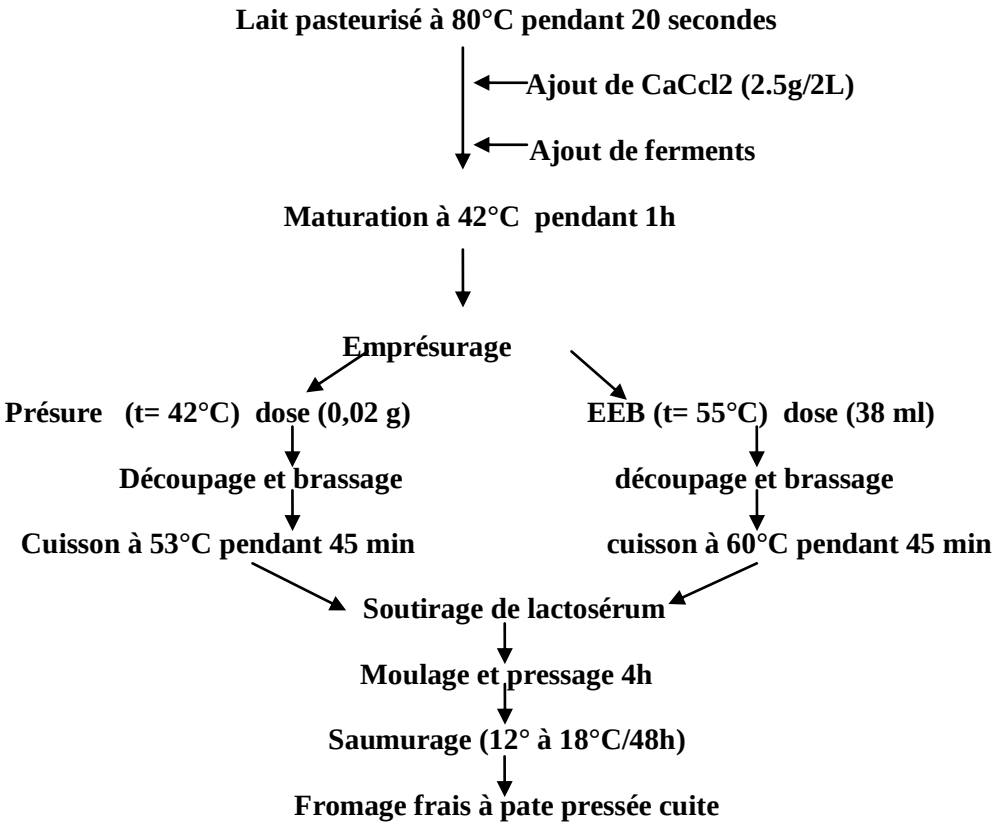


Figure 8 : diagramme de la fabrication de fromage.

IV.2. Analyses physico-chimiques du fromage

- **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 la teneur en matière grasse**

La teneur en matière grasse du fromage est déterminée par l'utilisation de la méthode acidobutyrométrique de Van Gulik **(AFNOR, 1993) (Annexe 4).** Le principe de cette méthode est identique à celui de la méthode de Gerber, il repose 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.

- ✓ **Lecture de résultat**

Obtention de la teneur en matière grasse par lecture directe sur l'échelle du butyromètre. Le résultat est exprimé en gramme pour 100g de fromage.

- **Détermination de l'extrait sec total (EST)**

La teneur en extrait sec total est déterminée à l'aide d'un dessiccateur à lampe halogène.

- **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 :

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

IV.3. 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 (souvent 100 L ou 100Kg) **Vandewegh, (1997).** Il est déterminé par la formule suivante :

$$\mathbf{Rdt = 10 \times ESD \times Pds/V}$$

Rdt : Rendement fromager

ESD : Extrait sec dégraissé

Pds : Poids

V : Volume du lait mis en œuvre

IV.4.Analyse sensorielle du fromage

L'appréciation de la qualité d'un produit alimentaire, même si elle peut être faite en partie par voie instrumentale, doit obligatoirement avoir comme référence la voie directe expérimentale qu'est l'analyse sensorielle, qui consiste à analyser les propriétés organoleptiques des produits alimentaires par les organes de sens **(Charnay et Tourmeau 2006).**

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 échantillons du fromage fabriqué (type 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 **(annexe 5),** 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 1 à 5 :

- **1** = 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 **(annexe 6 et 7).** Le seuil de probabilité est de 5% (p = 0.05).

RESULTATS

&

DISCUSSION

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 brune.

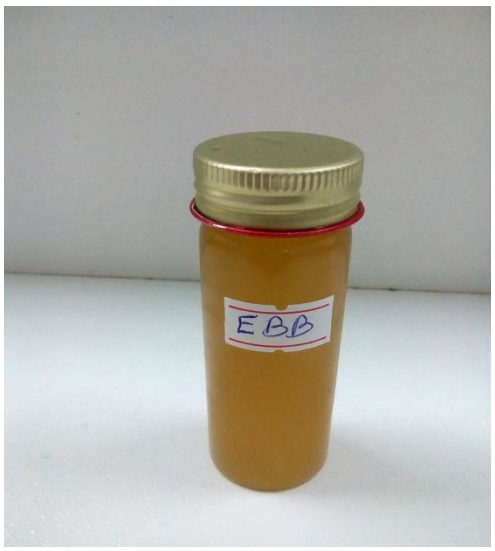


Figure 9 : Caractère apparent de l'extrait enzymatique

I.2. Activité coagulante de l'EEB

Après l'extraction, l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut issue de *Bacillus amyloliquifeciens* a été déterminée par les méthodes de Soxhlet et de Berridge. Les résultats obtenus sont rapportés dans le **(tableau 3)**.

Tableau 3 : Activité coagulante de l'extrait enzymatique brut

	Force coagulante (Us)	Activité coagulante (Up)
EEB de *Bacillus amyloliquifeciens*	52	0,22 UP/ml

La force coagulante de l'extrait brut est de l'ordre de 1/52 ± 4 ce qui indique qu'un ml d'extrait enzymatique coagule 52 ± 4 ml de substrat de Berridge. Exprimée en Up, l'activité coagulante est de l'ordre de 0.22 ± 0,01 Up/ml.

Tableau 4: Comparaison de l'AC de l'EEB aux autre AC des coagulases

Souche	Us	Up/ml
EEB de *Bacillus amyloliquefaciens*	52± 4	0,22 ± 0,01
Présure[*]	537	/
B. mojavensis [**]	150	0,625
Mucor circinelloides [**]	640,085	2,667
Pepsine de poulet [***]	13142	60,06

[*] [109], [**] [5], [***] [6]

Comparée aux activités de présure bovine de référence et aux données bibliographiques relatives aux autres origines d'extraits enzymatiques, la force coagulante obtenue est relativement faible **(tableau 4) ,** cette différence pourrait s'expliquer par les conditions de fermentation. En effet, selon **Ding *et al* (2011)** l'activité coagulante d'un extrait enzymatique est influencée par de nombreux facteurs du milieu entre autre la concentration en glucose, la taille de l'inoculum, le temps d'incubation, le volume du milieu. Cette observation impose une optimisation du milieu de culture**.**

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

La teneur en protéines de l'EEB déterminée par la méthode colorimétrique de **Lowry (Lowry *et al*., 1951) (Annexe 1)** est de l'ordre 510 µg/ml.

En outre il faut signaler que la teneur déterminée représente les protéines totales. La séparation lors d'une purification des diverses protéines permettra de mesurer la concentration des protéines coagulantes recherchées.

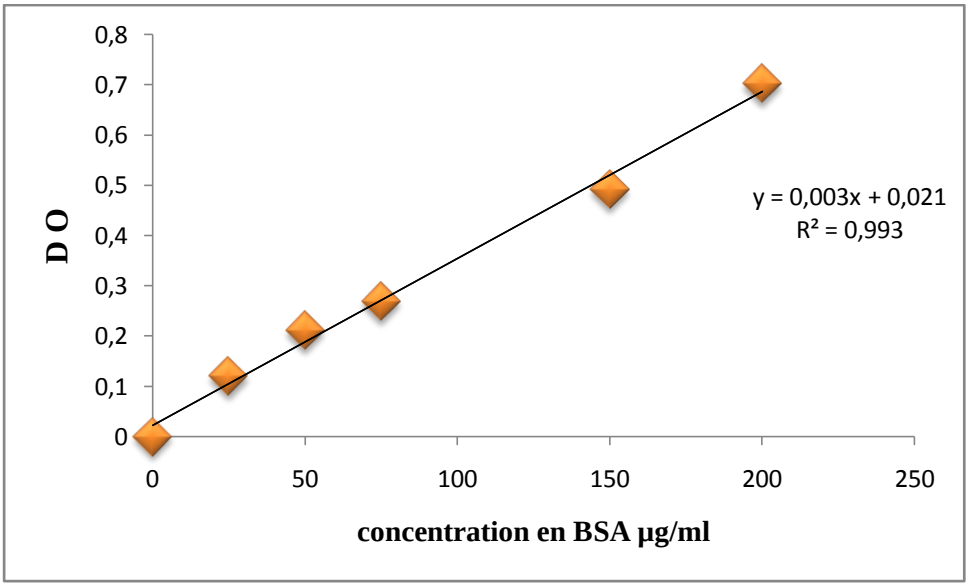


Figure 10 : Courbe étalon de sérum d'albumine bovin (BSA)

I.4. Activité protéolytique, indice AC/AP

Les résultats de l'activité protéolytique et le rapport AC/AP de l'EEB sont indiqués par le **tableau 5**.

Tableau 5 : activité protéolytique et rapport AC/AP de l'EEB

	activité protéolytique DO_{660}	Ratio (AC/AP) (Us/DO_{660})
EEB	0.496±0.001	104,8
Présure (Chwen *et al.*, 2010)	0.115±0.002	4669,6

Les résultats du **(tableau 5)** montrent que l'activité protéolytique obtenue par l'EEB est forte par rapport à la présure de référence. Selon **Rao et Mathur (1976),** les enzymes coagulantes d'origine microbienne présentent généralement une forte activité protéolytique comparée à la présure.

Le rapport AC/AP obtenue par l'EEB est beaucoup plus faible par rapport à celui obtenu par **Chwen *et al* ., (2010)** pour la présure, ceci indique que l'activité protéolytique de l'EEB est élevée.

I.5. Les conditions optimales de l'activité coagulante

I.5.1. 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 5.5 à 8 avec un pallier de 0.2.

La **figure 11** montre que le pH optimal d'hydrolyse de la caséine par l'EEB est de 5.5 avec une activité coagulante de 0.22 UP/ml. Au-delà de ce pH on observe une chute graduelle de l'activité coagulante, puis elle s'annule au pH de 8 (inhibition totale de l'EEB).

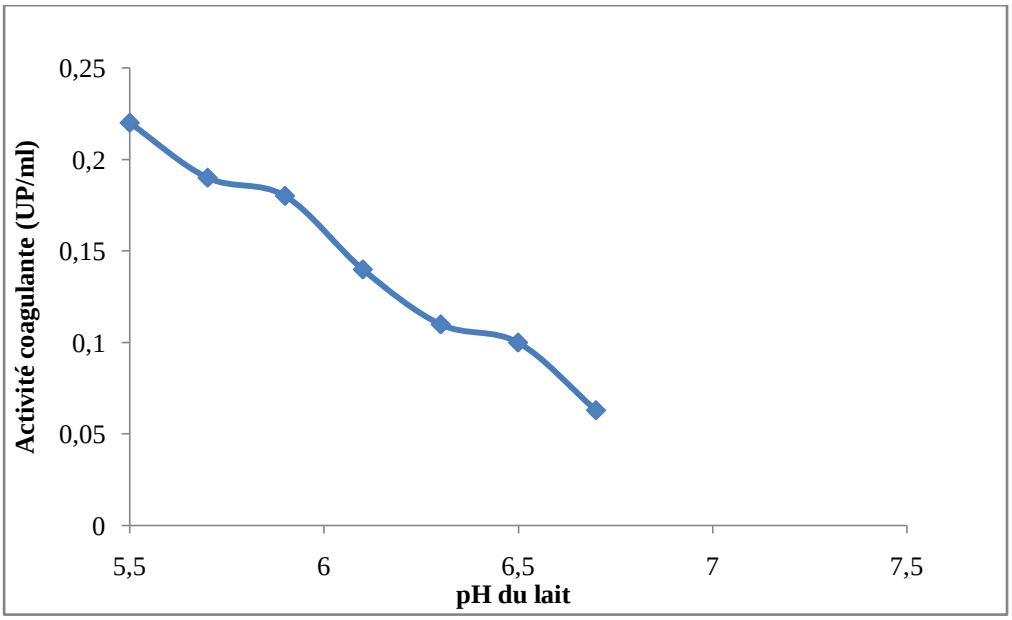


Figure 11 : effet du pH sur l'activité coagulante de l'EEB.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **Zhongyang *et al.*, (2011)**. 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. En outre ils se rapprochent de ceux de **Yang *et al.*, (1987)** qui dans une étude similaire sur une coagulase purifié de *Bacillus subtilis* ont rapporté un pH d'activité optimal de 5,8.

Selon **Garnot et Martin (1980)**, le pH d'activité de la présure est compris entre 5,3 et 6,3. Son optimum d'action est à pH 5,8 et elle est inactivée à pH 7,5.

Morsli (1996), indique un pH optimum de 6,5- 6,2- 6,5 pour des préparations enzymatique de l'artichaut, du figuier et du poulet respectivement.

I.5.2. Influence de la température sur l'activité coagulante

L'influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut a été étudiée dans un intervalle de température de 30°C à 85°C avec un pas de 5°C**.**

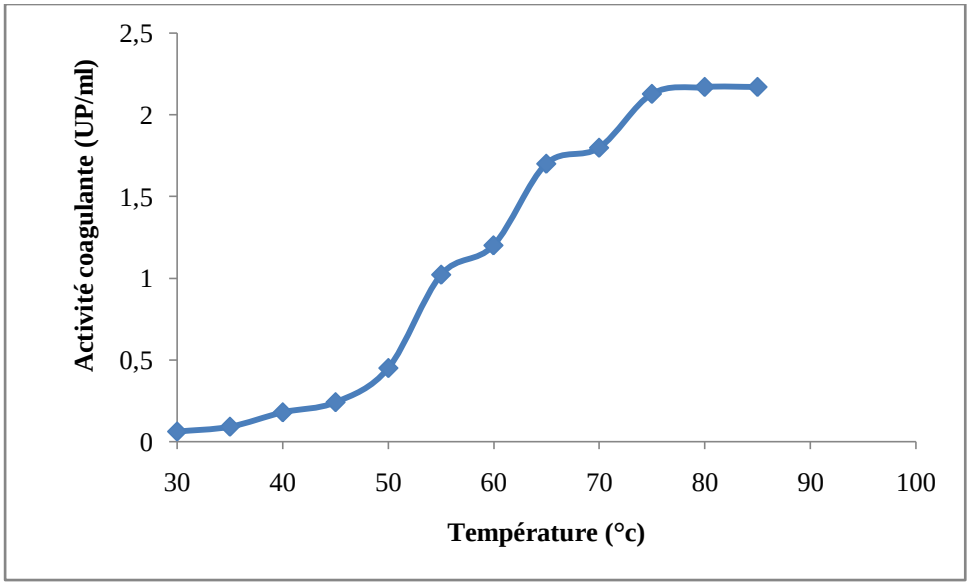


Figure 12 : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'EEB

Les résultats rapportés dans la **figure 12** indiquent que l'activité coagulante augmente avec l'élévation de la température pour atteindre son optimum au voisinage de 75°C (2.13 UP/ml).

Chopra et Mathur (1985), ont obtenu une coagulase purifiée de *Bacillus stearothermophilus* avec une activité optimale à 70°C. **Matoub (2000),** a montré que l'activité optimum de l'enzyme purifié de *Bacillus subtilis* est de 70°C.

Selon **Garnot et Martin (1980)**, la présure est caractérisée par une activité optimale à une température voisine à 42°C. D'après **Morsli (1996),** l'optimum d'activité obtenue pour l'extrait enzymatique du figuier a été enregistré à 85°C, pour l'artichaut est de 72°C.

En général, les extraits enzymatiques d'origine animale ont une activité importante à des températures modérés cependant les coagulases d'origine microbienne et végétale se montrent plus actives aux températures élevées **(Talantikite, 2015).**

I.5.3. Influence de la concentration en $CaCl_2$ sur l'activité coagulante

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 amylolequifeciens*, 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 13** montrent que l'activité coagulante de la protéase croit avec la concentration en $CaCl_2$.

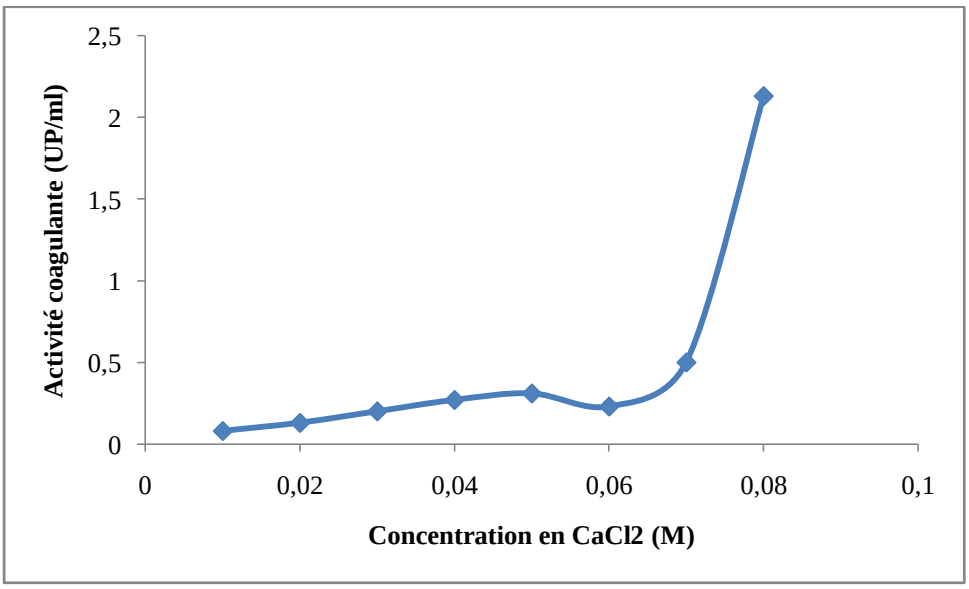


Figure 13: Influence de $CaCl_2$ du lait sur l'activité coagulante d'EEB

Dans une étude similaire **Talantikite (2015)** a obtenus une activité coagulante de *Bacillus majovensis* optimum à une concentration de 0,04 M.

Par ailleurs, **Morsli (1996)**, lors d'une étude du pouvoir coagulant de quelques plantes locales et d'une coagulase de poulet indique une concentration du lait en $CaCl_2$ de l'ordre de 0,02M pour l'ensemble des préparations et d'après **Chopra et Mathur (1985),** une activité optimale de la présure est obtenue à 0,02M de $CaCl_2$.

Toutefois, **Chemlal (1998)**, a rapporté une activité optimale de 50mM pour la protéase de *Bacillus subtilis.*

Aussi, on peut conclure que les enzymes d'origine microbienne sont les plus sensibles à la baisse des concentrations en $CaCl_2$.

II. Analyses physicochimiques du lait

La composition physicochimique du lait utilisé pour la fabrication des fromages a été, préalablement, déterminée. Les résultats sont indiqués dans le (**tableau 6)**.

Tableau 6 : Composition physico-chimique du lait utilisé dans la fabrication du fromage

Paramètre	Acidité (°D)	pH	MG %	Densité à 20°c	EST%	ESD%
Valeur obtenue	18	6	3,0	1,031	11,8	88
Norme J.O	15-17	6,5-6,8	3,4-3,6	1,028-1,033	10,2-12,5	87,5-89,9

Les résultats de la composition du lait utilisé pour la fabrication fromagère montrent que le profil physicochimique concorde avec les normes de référence.

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 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

La composition physicochimique des deux fromages élaborés est indiquée dans le **tableau 7.**

Tableau 7 : Composition physicochimique et rendements fromagers des fromages obtenus.

Paramètre	pH	EST %	ESD %	MG%	MG/EST (%)	Rendement fromager (%)
F_P	4,57	50,69	29,69	21	41.42	28,95
F_{EEB}	4,6	40,49	27,49	13	32.10	37,25

Les résultats des analyses physicochimiques indiquent que l'emploi de l'EEB donne un fromage ayant un pH et une teneur en ESD comparables à ceux de fromage à base de la présure.

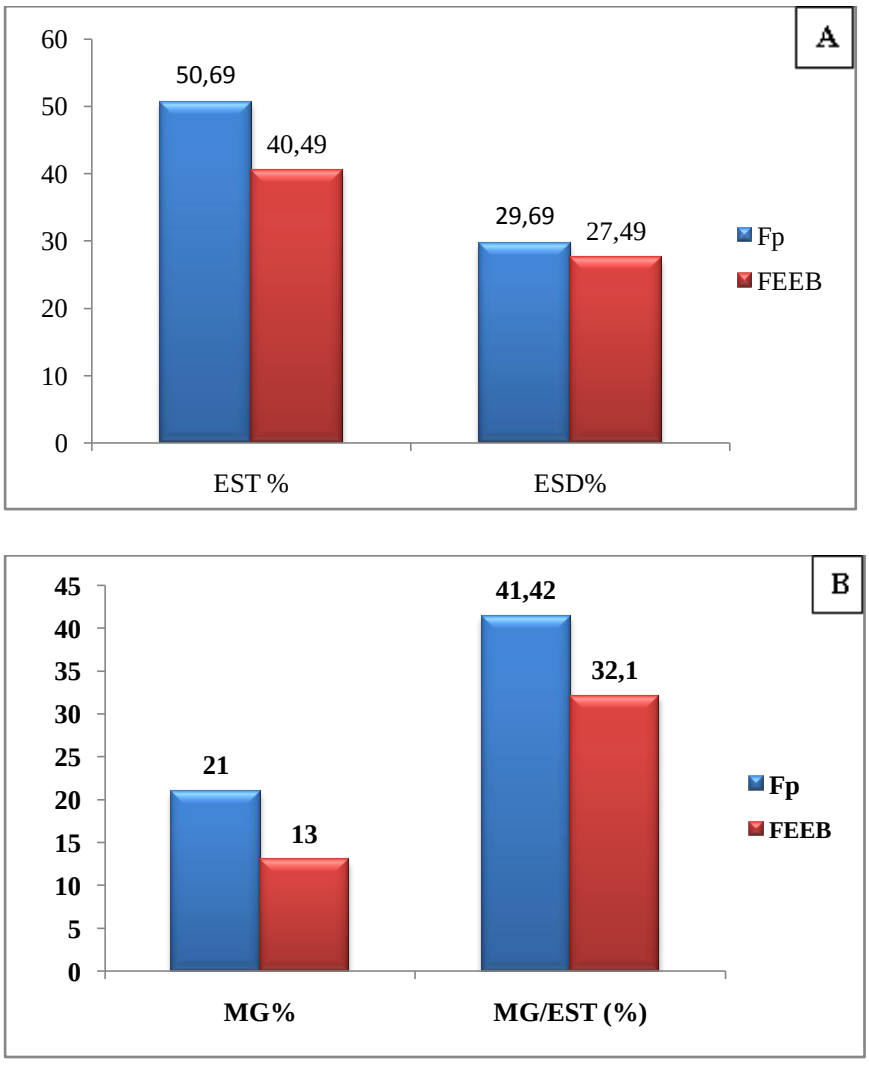


Figure 14: Variation des principaux paramètres physicochimiques des deux types de fromage

Par ailleurs, la teneur en MG et en la teneur en EST demeurent plus élevée pour le fromage à base de la présure industrielle.

Le rapport Matière Grasse/ Extrait sec total, caractéristique importante des fromages. La **figure 14 (B)** 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) autrement dit, une faible variation de rendement peut avoir des conséquences économiques importantes **Vignola (2010)**.

La **figure 15** donne les rendements fromagers des différents échantillons du fromage fabriqués au cours de l'expérimentation.

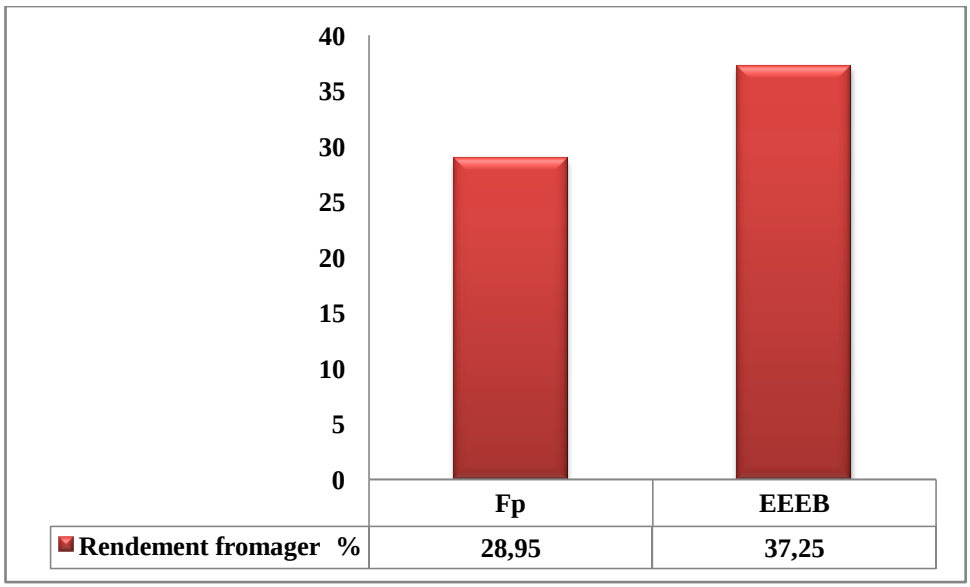


Figure 15 : Rendements fromagers des différents échantillons de fromage

Selon la **figure 15** et **le tableau 7** 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 **(37,25%)** par rapport à celui fait à base de la présure **(28,95%).**

En effet, malgré la forte activité protéolytique dont est dotée l'extrait enzymatique brut de *Bacillus amylolequifaciens*, les pertes en rendement sont faibles (**figure 15**), cela est

probablement dû à l'effet du traitement thermique exercé sur le caillé au cours de la cuisson qui a inactivé l'activité protéolytique de l'enzyme.

Selon **Fenelon et Guinee (1999),** les facteurs influant sur le rendement fromager inclurent la composition du lait, la quantité et les variantes génétiques de la caséine, la qualité du lait, comptage des cellules somatiques (CCS) dans le lait, la pasteurisation du lait, le type coagulant, la fermeté du caillé à la coupe et les paramètres de la fabrication.



Figure 16 : Fromage fait à base d'EEB.



Figure 17: Fromage fait à base de la présure.

III.2. Analyse sensorielle du fromage

Les caractéristiques organoleptiques ont été évaluées à l'aide du Quick Rank Test de KRAMER **KRAMER (1960)**. Cette méthode est appréciée par le calcul de la moyenne des scores (notes attribuées par les 10 panélistes pour chaque lot) et la somme des rangs (classement selon le score des différents lots). La différence entre les différents lots (les deux fromages) est jugée non significative dans l'intervalle de rang total compris entre 11 et 16, au seuil de probabilité de 5%. Les résultats de l'analyse sensorielle portant sur les critères **(annexe 7):** couleur, épaisseur de la pâte, odeur, salinité et dureté des fromages à pâtes pressées cuites préparés avec l'EEB et la présure commerciale sont représentés sous forme de tableau récapitulatif (**tableau 8**) et d'histogrammes **(figures 18,19,20,21,22).**

Tableau 8: Tableau récapitulatif des résultats de test de dégustations obtenus sur les fromages élaborés .

Fromage / Caractère	F_p		F_{EEB}	
	MS	SR	MS	SR
Couleur	3,5	16	3,7	14
Épaisseur de la pâte	3,9	12	3	18
Odeur	3,4	15	3,3	15
Salinité	4,6	17,5	5,3	12,5
Dureté	3,7	15	3,4	15

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

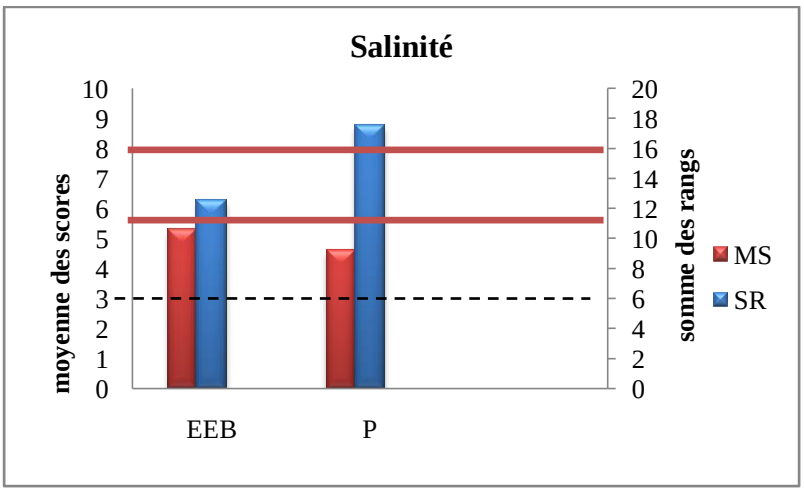


Figure 18: Histogramme des résultats des analyses de la salinité des fromages fabriqués.

- - - - Limite d'acceptabilité de MS

Intervalle de signification [11,16]

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 significativement mauvais.

Par ailleurs, la moyenne des scores attribuée aux deux fromages (4.6 et 5,3) respectivement pour le fromage présure et le fromage EEB, permet de constater que la salinité n'est pas appréciée par l'ensemble des panélistes.

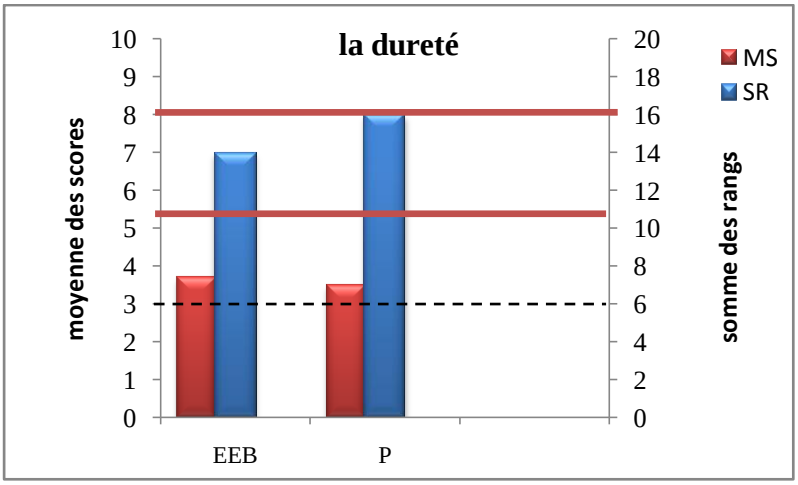


Figure 19: Histogramme des résultats des analyses de la dureté des fromages fabriqués.

Sur le plan dureté et selon **la somme des rangs** (SR), aucune différence significative n'est observée entre les deux fromages faits à base présure et de EEB au seuil de probabilité de 5%. Toutefois, **les moyennes des scores** relevés pour les deux fromages se rapprochent les unes des autres et sont supérieures à limite acceptable.

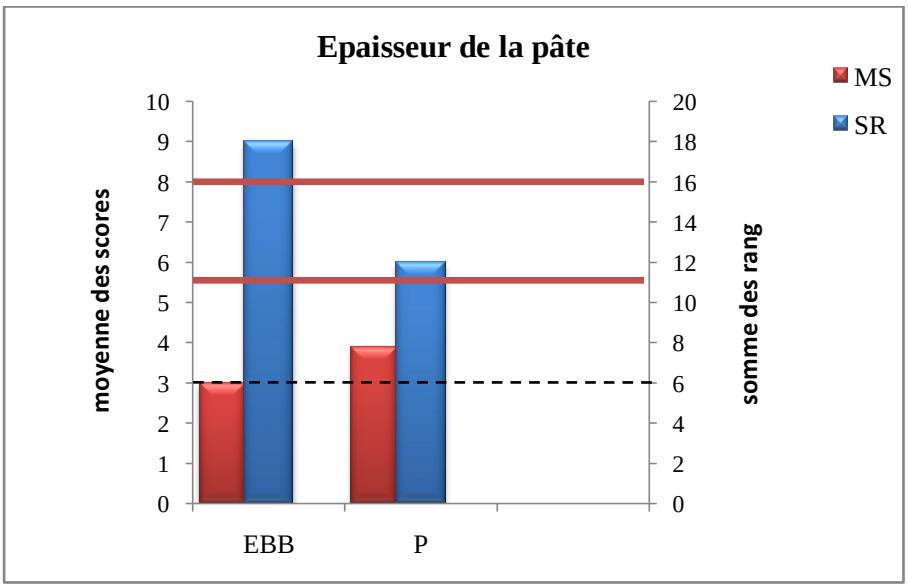


Figure 20: Histogramme des résultats des analyses de l'épaisseur de la pâte des fromages fabriqués.

Selon la somme des rangs (SR), le fromage EEB se situe au dessus de la limite supérieure de signification, il est donc statistiquement mauvais. Cependant, le fromage présure se situe dans l'intervalle de signification **[11,16].**

Selon la moyenne des scores (MS), l'épaisseur du fromage présure est la mieux appréciée par les panélistes avec un score égale à 3.9.

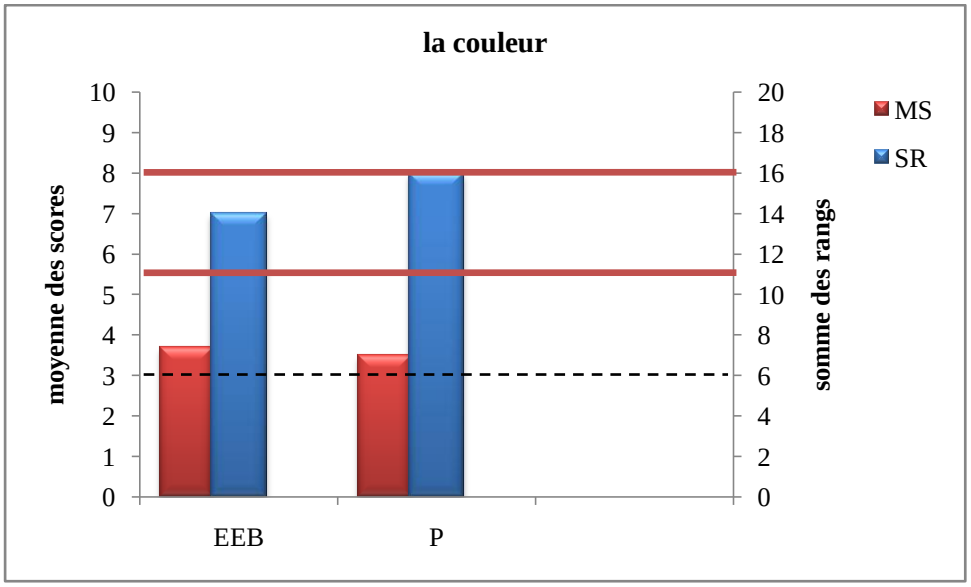


Figure 21: Histogramme des résultats des analyses de la couleur des fromages fabriqués.

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 en couleur 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 supérieures à limite acceptable.

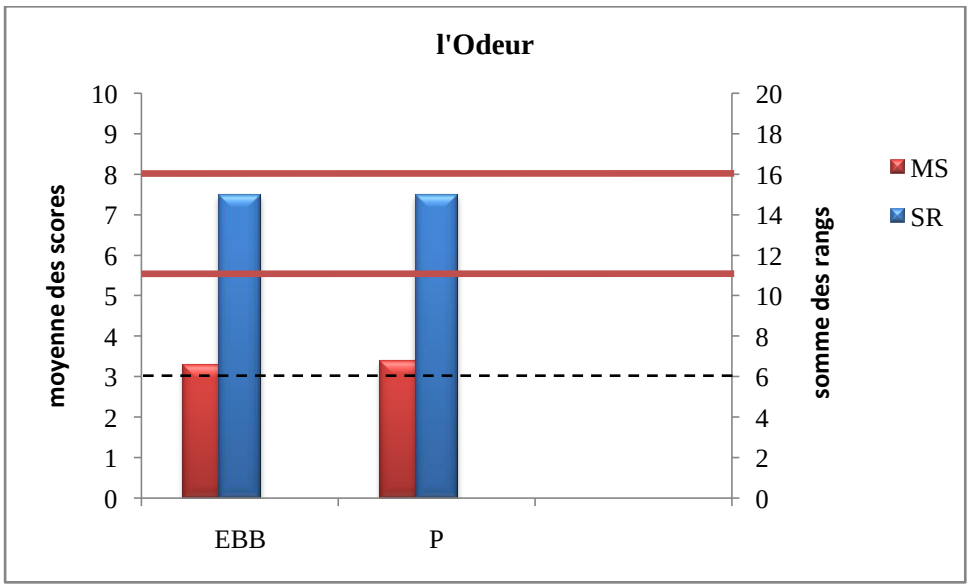


Figure 22: Histogramme des résultats des analyses de l'odeur des fromages fabriqués.

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 supérieures à limite acceptable.

CONCLUSION

Conclusion

La présente étude nous a permis de contribuer aux travaux de recherches préexistants dans le domaine des protéases coagulant le lait et de renforcer l'idée de pouvoir trouver de nouvelles sources potentielles de succédanés de la présure traditionnelle.

L'objectif de notre étude est d'évaluer les potentialités coagulantes et protéolytiques d'une protéase, produite par la culture d'une souche isolée localement, *Bacillus amyloliquefaciens.*

Les conditions de fermentation sur milieu solide (30g supplémenté de 2,5 g de lait écrémé dans 60ml de sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ 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 $CaCl_2$), 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 0.22 Up, avec une activité protéolytique élevée de 0.494 DO660 et un indice AC/AP de 104,8 ; valeur assez faible pour que l'enzyme puisse avoir l'opportunité d'être utilisée en fromagerie.

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 $CaCl_2$ 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 de chaque fromage élaboré montrent que ce dernier est plus important pour le fromage préparé avec l'EEB (37,25%) par rapport à celui fait à base de la présure (28,95%).

Les tests organoleptiques 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 (milieu de culture, taille de l'inoculum…)
- Purifier l'enzyme par l'emploi des différentes techniques de purification à savoir la chromatographie d'exclusion moléculaire.
- Orienter un thème de recherche sur la bio dépollution par l'emploi de l'enzyme issue de la fermentation de *Bacillus amylolequifaciens.*

Références bibliographique

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

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

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

Aimutis W.R., 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *Journal of Nutrition* 134(4): S989-S995.

Alais C., 1984. Science du lait: principes des techniques laitières. Ed. SEPAIC.Paris, 814p.

Alais C. Et Linden G., 1997. Abrégé biochimie alimentaire**.** Masson, Paris.

Alves D'oliveira L., 2007. Composition chimique du lait, [en ligne], Cours de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Alimentation des Animaux, [http://www2.vet-lyon.fr/ens/nut/webBromato/cours/cmlait/compolai.html] (consulté le 26/06/09).

Amiot J., Fournier F., Lebeuf Y., Paquin P Et Simpson R., 2002. Science et technologie du lait : transformation du lait. *Presses internationales Polytechnique*, Montréal, 1-73.

Andrén, A., 2002. Rennets and coagulants. In H. Roginski, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.), Encyclopedia of Dairy Sciences (pp. 281–286). London: Academic Press.

Arima K ; Yu J ; Et Iwasaki S., 1970. milk-clotting enzyme from *mucor pusillus* var. lindt. In méthds in Enzymology, Vol. 19 (Perlman, G.E. & Lorand, L; ed). Academic press, New York, pp, 446-459.

Balaban N.P, L.A Malikova, A.M Mardanova, G.N Rudenskaya, M.R. Sharipova., 2007. Purification and characterization of a subtilisin-like proteinases secreted in the stationary growth phase of *Bacillus amyloliquefaciens* H2.*in Biochemistry* (Mosc).- Vol.72. 4.- P.459-465.

Banat, I.M.,Makkar, R.S. And Cameotra, S.S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 53: 495 – 508.

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.

Benyahia F. A., 2013. Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vue d'une valorisation des proventricules de volailles au profi t de la filière lait en Algérie. Thèse de doctorat : Sciences Alimentaires. CONSTANTINE : institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires I.N.A.T.A-A, 119p.

Boiron P., 1996. Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. P:13-69.

Boudier J.F., 1974. Présure et succédanés de la présure. Série de synthèses bibliographiques. Ed. Tec et Doc., APRIA., France. 3, 873.

Boutonnier JL., 2008. Matière grasse laitière Composition, organisation et propriétés. Dans Techniques de l'ingénieur, Traité Agroalimentaire (F 6320), Paris.

Breccia J. D., Siñeriz F., Baigori M. D., Castro G. R. And Hatti- Kaul.R., 1998. *Enzyme Microb. Technol*., 22, 42.

Charnay P., Tourmeau J., 2006. Guide pratique de la dégustation. Petit futé, Paris, 287p.

Chemlal B., 1998. Caractérisation et purification partielle de coagulases des souches *Bacillus subtilis* et *Bacillus coagulans*, Mémoire, ing, U.S.T.H.B, Alger.

Chopra et Mathur., 1985. Purification and characterisation of heat stable proteases from *Bacillus stearothermophilusJ. App Bacteria*., 15, p 355 -358.

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.

Chung. H And Friedberg. F., 1985. *Biochem. J*., 180, 387.

Chwen-Jen Shieha, Lan-Anh Phan Thi B, Ing-Lung Shihb., 2010. Milk-clotting enzymes produced by culture of Bacillus subtilis natto. *Biochemical Engineering Journal* 43, 85–91.

Coker, C.J., Crawford, R.A., Johnstona,K.A., Singhb, H., Creamer, L.K., 2005. Towards the classification of cheese variety and maturity on the basis of statistical analysis of proteolysis data—a review. *International Dairy Journal* 15 (2005) 631–643.

Collin J.C., Grappin R Et Legraet Y., 1997. Etude de la méthode de mesure, selon Berridge, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. *Rev. lait. Franç.*, N°335.p.p.389-394.

Cuvellier G F., 1993. Production des enzymes *in* Biotechnologie. Coord. Scriban R. 4ème édition Tec. et Doc. Lavoisier PP 948.

Dalgleish, D.G., 1993. The enzymatic coagulation of milk. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 2nd edn (ed. P.F. FOX), vol. 1, pp. 69–100. Chapman & Hall, London.

Dalgleish D.G. Et Holt C., 1988. A Geometrical model to describe the initial aggregation of partly renneted caseinmicelles. *Journal of colloid and interface science*, vol123, N°1.

Debry G., 2001. Lait, Nutrition et santé. . Jean-Pierre Poulin « Représentation sociales du lait». Ed : Tec et Doc. Paris. Lavoisier, 498p.

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.

Eck A., 1987. Le fromage, Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, 2eme

édition, Paris. P. 529.

Eck A., 1990. Le fromage, Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, 2eme édition, paris. P. 539.

Eck Andre Et Jean Claude Gillis., 1997. Les Enzymes D'origine Animale : Le Fromage De La Science A L'assurance Qualité, 3ème Edition, Lavoisier Tec& Doc. Paris.

Emtage J. S., Angal S., Doel. M. T., Harris T. J.R.. Jenkins, B., Lilleyg. And Lom E P. A., 1983. Synthesis of calf prochymosin (prorennin). Escherichia coli. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, SO. 3671-3675.

Ernstrom, C.A., And Wong, 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.

Fao, Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Produit par: Département de l'agriculture. Collection FAO: Alimentation et nutrition n° 28. ISBN 92-5-20534-6. http://www.fao.org/docrep/t4280f/t4280f00.htm .

Fenelon Ma, Guinee Tp., 1999 . The effect of milk fat on Cheddar cheese yield and its prediction using modifications of the van Slyke cheese yield formula. *J Dairy Sci* 82:22872299.

Fox P.F, O'connor T.P., Mcsweeney P.L.H., Guinee T.P. & O'brien N.M., 1996. Cheese: physical, chemical, biochemical and nutritional aspects. *Advances in Food and Nutritional Research*, 39, 163–328.

Fox, P.F & Mcsweeney, P.L.H., 1997. Rennets : their role in milk coagulation andcheese ripening. *The Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2nd edn (ed. B.A. Law). Chapman & Hall, London pp. 1–49.

Fox P.F, Timothy P. Guinee, Timothy M. Coganpaul , L.H. Mcsweeney., 2017.

Fundamentals of Cheese Science. New York :*Second Edition* © Springer**, 77**1P**.**

Gaiani, C., Scher, J., Schuck, P., Hardy, J., Desobry, S., Banon, S., 2006. The dissolution behaviour of native phosphocaseinate as a function of concentration and temperature using a rheological approach. *International Dairy Journal* 16(12), 1427-1434.

Gaucheron F., 2004. Minéraux Et Produits Laitiers, Tec & Doc, PP 473.

Garnot P., Et Martin P., 1980. La présure : composition, détermination de l'activité, son rôle en fromagerie. *Technique laitière*. 930, N°3, 27-30.

Glantz M., Mansson H. L., Stalhammar H., Paulsson M., 2011. Effect of polymorphisms in the leptin, leptin receptor, and acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) genes and genetic polymorphism of milk proteins on cheese characteristics. *Journal of dairy science*, 94(7), p.3295-3304.

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.

Granday Et Mietton, 2015. Présure et coagulant de substitution comment faire le bon choix ?, les substituts de présure. Quae Editions, Versailles, France, 192 p.

Green M.L., 1977. Review of the progress of dairy science: Milk coagulants *J. of Dairy Res*.44:159-188.

Hang, F., Liu, P., Wang, Q., Han, J., Wu, Z., Gao, C., Liu, Z., Zhang, H., Chen, W., 2016. HighMilk-Clotting Activity Expressed by the Newly Isolated *Paenibacillus* spp. Strain BD3526. 21, 73-86.

Harbutt., 2010. Le grand livre des fromages. Milan, Toulouse, France, 354p.

Harwood C. R., 1989. Bacillus. Biotechnology Handbooks. 2. Edited by T. Atkinson & R. F. Sherwood. New York & London: Plenum.

He X., Ren, F., Guo,H., Zhang, W., Song ,X.,Gan, B.,2010, Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4. *Korean J. Chem. Eng*., **28**(1), 203-208.

He X., Ren Z., Guo H., Zhang W., Song X., Gan B., 2011. Purification and properties of a milk clotting enzyme producedby Bacillus amyloliquefaciensD4.Korean *J . Chem. Eng*., 28(1), p.203-208.

Henri G, Benedicte C.C, Jean-Yves G, Pierre S., 2008. Procédés De Transformation Fromagère- Partie 1, Pp 305.

Holt, C., 1992. Structure and stability of bovine casein micelles. *Advances in Protein Chemistry*,Volume 43, (eds C.B.Anfi nsen, J.D. Edsall, F.R. Richards & D.S. Eisenberg), pp. 63–151, Academic Press, New York.

Horne D.S. Et Banks J.M., 2004. Rennet-induced coagulation of milk. In: *Cheese:Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd edn (eds P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan & T.P. Guinee), vol. 1,pp. 19–45. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

Huppertz T., Upadhyay V.K., Kelly A.L. 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.

Irlinger F Et Mounier J., 2009. Microbial interctions in cheese : Implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*., 20: 142-148.

Jeantet R., Croguennec T., Madrant., Schuck P Et Brule G., 2008. Les produits laits, *2ème édition TEC et DOC Lavoisier*, 185p.

Jensen L.J.. Molgaard A.. Poulsen J.C.N., Harboe M.K.. Simonsen J.B., Lorentzen A.M., Hjerno K.. Van Den Brink J.M., Qyist K.B. And Larsena S., 2013. Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties. *Acta Cryst*.. 69.901-913.

Johnson M E And Luceyj A., 2006. Major technological advances and trends in cheese. *Journal of Dairy Science* 89 1174-1178.

Kramer A., 1960. A rapid method for determining significance of differences from rank sums. *Food technology* 14, 576-581.

Kumar A.. Grover S., Sharma J. And Batish Y.K., 2010. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Crit. Rev. Biotechnol*..
30(4). 243-
5S.

Kumar S., Sharma N. S., Sharab M.R, Et Singb R., 2005. Extracellular acid protease from Rhizopus oryzae : purification and characterization.*Process Biochemistry*. Vol:
40. PP 1701-
1705.

Lee H, Suh Db, Hwang Jh, Suh Hj., 2002. Characterization of a keratinolytic metalloprotease from Bacillus sp. SCB-3. *Appl Biochem Biotechnol* 97: 123-133.

Lenoir, J., 1985. Les caséines du lait. Rev. Lait. Fr., 440, 17-23.

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.

Lucey, J.A.; Fox, P.F., 1993. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review. *J. Dairy Sci*., v.76, p.1714-1724.

Lucey J.A., 2002. Rennet coagulation of milk *in* ROGINSKI H., FUQUAY J. FOX P.*Encyclopedia of Dairy Science*. Elsevier :286-293.

Luquet F. M., 1985. Laits et produits laitiers - Vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits De la mamelle à la laiterie. *Tech. & Doc., Coll*. STAA, Lavoisier, Paris.

Madji A., 2009. Séminaire sur les fromages AOP ET IGP.INAT. Tunisie.

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., 2003. Initiation à la technologie fromagère. Paris, Lavoisier, Technique Et Documentation, Lavoisier, France ; Pp 24-102.

Marcus S, Ajay S, And Owen P. W., 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production . *in Can. J. Microbiol*.**50**: 1–17.

Matoub L., 2000. Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33). Mémoire de Magister. Sciences alimentaires. I.N.A. El-Harrach.

Mohanty A.K.. Ml Khopadhyay U.K., Gro\ Er S. And Batish Y.K., 1999.Bovine chymosin: production by rDNA tcclmology and application in cheese manufacture. *Biotechnol. Adv.* 17 205-217.

Montserrat Almena-Aliste., Bernard Mietton., 2014. Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective by American Society for Microbiology.

Morsli A., 1996 : Recherche sur les activités protéasiques de l'extrait de *Cynara scolymus*, du latex de Ficus calice et du pro ventricule de Gal/us gal/us en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Thèse de Magister. Sciences alimentaires. I.N.A. El-Harrach.

Noseda D.G., Recupero M.N., Blasco M., Ortiz G.O. And Galvagno M.A., 2013. Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in Pichia (Komagataella) pastoris under AOX1 promoter. *Prorein Exprès. Puri/*.92. 235-244.

Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Sorokulova, I.B., Verneuil, B.,And Urdaci, M.C., 2002. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Res Microbiol* 153: 269–276.

Pointurier H., 2003.La gestion matières dans l'industrie laitière. Edition Technique Et Documentation, Lavoisier ; Londres-Paris- New York. PP 292-293.

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

Puhan Z., Irvine D. M., 1973. Proteolysis by proteases of Bacillus subtilis used to make Canadian Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, *56*(3), 317-322

Ramet J.P., 1985. Study of enzymatic coagulation of camel milk in Saudia-Arabia. Mission Report. FAO.

Ramet J. P., 2006. Les agents de la transformation du lait ; in « le fromage ». Ed. Eck et Gillis. Technique et documentation, 3eme édition, lavoisier, Paris, 891p.

Rao K, Mathur Dk., 1976. Studies on the production of bacterial rennet in pilot plant fermentor). *Biotechnol. Bioeng*. 17:1349-1351.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*., 62; 597–635.

Rappeler S.R., Van Den Brink H.M.. Rahbec K-Nielsen H.. Farah Z.. Pu Han Z.. Bech Hansen E. And Johansen E., 2006. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biocheni. Biophys. Res. Commun.*. 342. 647-654.

Robert W. Hutkins., 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods.USA: First edition, 457P.

Roseiro L.B.. Barbosa M., Ames J.M. And Wilbey R.A., 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants-the use of Cynara L. for the production of ovine milk cheeses. *Int. J. Dairy Tech.*. 56. 76-$5.

Samia A. Ahmed, Hala R. Wehaidy, Osama A. Ibrahim, Salem A. Hasan, Mahmoud A. El-Hofi., 2016. Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese.In *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. *http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.01*.

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

Schmidt D.G., 1982. Association of caseins and casein micelle structure. *In*: Developments of dairy chemistry 1-proteins. *Applied science publishers*. 61-86.

Shahzad,F., Ahmed,S., Ahmed,H., Rashid,Q A., Parveen,N.,Javed,F.,Khan,R.,Ashraf ,M Z.,Naseer,F., 2015. Production of Proteases by Genetically Improved Bacillus subtilis for Enhanced Skin Penetration of Antibacterial Topical Formulation.*Biotechnology & Biomaterials* , 5:2.

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

Snappe J.J., Lepoudere A., Sredzinski N., 2010. Protéines laitières. Techniques de l'Ingénieur F4 820,1-19.

Talantikite K. S., 2015. purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie.Thèse de doctorat : technologie alimentaire. BOUMERDES : Université M'HAMED BOUGUARA, 167p.

Tang Xm, Shen W, Lakay Fm, Shao Wl, Wang Zx, Et Al., 2004. Cloning and over expression of an alkaline protease from Bacillus licheniformis. *Biotechnol Lett* 26: 975 979.

Tsouli J., 1979. Étude d'une protéase coagulante extraite de *cynara cardunculus L*. et *cynara scolymus*. Thèse de doctorat d'état es-sciences, université claude BERNARD de lyon,1-62.

Vandewegh J., 1997. Le fromage : Le rendement en fromage, Prédétermination et mesure. 2 eme édition, Tec Et Doc, Lavoisier, Paris, 875 p.

Veisseyre R., 1975. Technologie du lait. Constitution, récolte, traitement et transformation du lait. 3ème edition. La Maison Rustique, Paris, France, 713 p.

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

Vignola C.L., 2010. Science et technologie du lait : transformation du lait.2eme édition,Montréal. Presses Internationales Polytechniques. 588p.

Walstra P., Bloomfield V.A., Wei G.J. And Jenness R., 1981. Effect of chymosine on the hydrodynamic diameter of casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*,669: 258-259.

Wattiaux, M.A., 1997. *Dairy essentials (1st edition) : Nutrition and feeding,* The Babcock Institute Publications, University of Wisconsin-Madison, 1-28.

Wigley R.C., 1996. Cheese and whey in industrial enzymology. Second edition. Chapitre 27. Ed.Godfrey and Wiest., 135 N° 142.

Wu, F-C., Chang, C-W., Shih, L-L., 2013. Optimization of the production and characterization of milk-clotting enzymes by *Bacillus subtilis* natto. *Springer Plus*, 2, 33-42.

Yang W.P ., Kobayashi H., Et Kusakabe I., 1987. Purification and characterization of soymilk clotting- enzymes from *Bacillus sp* 2956. *Bio.Agri.Biochem*.59.9.2343-2349.

Zhang, W., He, X.,Liu, H.,Guo, H.,Ren, F. And Wen, P., 2013. Statistical optimization of culture conditions for milk-clotting enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* using wheat bran-an agro-industry waste, *Indian J Microbiol*, 53, 492-5.

Annexes

Annexe 1

1. Préparation de substrat de Berridge

➢ Constituants de substrat de Berridge

- Le lait en poudre, de type LOW-HEAT obtenu à partir d'un lait écrémé pasteurisé de bonne qualité microbiologique (-5000 germes/ml).
- Solution de $CaCl_2$ de qualité anhydre utilisée à une concentration de 0.01M est obtenue à partir d'une solution mère aqueuse de $CaCl_2$ déshydraté d'une concentration de 1M à conserver à 4°C et à l'obscurité avec quelques cristaux de thymol.

➢ Mode opératoire :

Pour préparer 100ml du substrat de Berridge, on dissout 12g de poudre de lait dans 100ml de $CaCl_2$ à 0.01M. On verse tout d'abord 10ml de la solution de chlorure de calcium dans le bêcher contenant le lait en poudre.

Remuer manuellement avec un agitateur de manière à obtenir une bouillie homogène. Ensuite, le reste de la solution de $CaCl_2$ est ajouté sur cette bouillie, puis on agite avec un agitateur magnétique durant 15 min en évitant une agitation trop violente susceptible de produire une mousse gênante. Puis vérifier le pH de la solution obtenue et l'ajuster s'il y a lieu à 6,4 par l'ajout d'une solution de HCl ou de NaOH. La température du substrat est ramenée à 35°C afin de mesurer le temps de coagulation, qui correspond à l'apparition des premiers flocons sur les parois internes du tube dans les conditions de réaction.

2. Dosage des protéines totales (Lowry & al, 1951)

➢ Solutions:

- **Solution (A):** 5% Na_2CO_3 ;
- **Solution (B):** 0,5% $CuSO_4, 5H_2O$ in Sodium- potassium tartrate à 1%;
- **Solution(C)**: 50 ml (A) + 2ml (B) (à préparer immédiatement) ;
- **Solution (D)** : NaOH (1N)
- **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.

Annexe 2

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	1695	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 $CaCl_2$

$[CaCL_2]$	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 3

Détermination de la teneur en matière grasse

- Mode opératoire :

On introduit dans le butyromètre de GERBER ;

- 10 ml d'acide sulfurique

- 11ml de l'échantillon

- 1ml d'alcool isoamylique

On ferme le butyromètre à l'aide d'un bouchon, puis on mélange jusqu'à la dissolution totale du mélange. On centrifuge pendant 3 minutes à 1200 tours / min. Le résultat est exprimé en g/l et la lecture se fait directement sur le butyromètre.

Annexe 4

Analyses physicochimiques du fromage

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

- **Mode opératoire**

3g du fromage sont broyés et introduits dans le godet du butyromètre. 10ml de l'acide sulfurique sont ajoutés, puis le butyromètre est placé dans un bain marie à 65°C jusqu'à dissolution totale du fromage. Le butyromètre est agité toutes les 5 minutes pendant la période de dissolution. 1ml de l'alcool isomylique est additionné.

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

- **Expression des résultats**

La teneur en matière grasse du lait et du lactosérum et fromage est exprimée en pourcentage massique.

n -n'

n' : valeur atteinte par le niveau supérieur de la colonne grasse

n : valeur atteinte par le niveau inférieur de la colonne grasse

Annexe 5

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 6

Table de Kramer

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 7

Paramètres sensorielles du fromage

La couleur

	F p		**F EEB**	
Panélistes	**score**	**rang**	**Score**	**Rang**
1	3	2	4	1
2	3	2	4	1
3	5	1,5	5	1,5
4	2	2	4	1
5	5	2	6	1
6	2	2	4	1
7	4	1	2	2
8	3	1	2	2
9	3	1	1	2
10	5	1,5	5	1,5
Moyenne du score	**3,5**		**3,7**	
somme des rangs		**16**		**14**

Épaisseur de la pate

	F p		**F EEB**	
Panélistes	**score**	**rang**	**Score**	**Rang**
1	2	2	3	1
2	4	1	3	2
3	4	1	2	2
4	3	1	2	2
5	6	1	4	2
6	3	1,5	3	1,5
7	5	1,5	5	1,5
8	4	1	2	2
9	3	1	2	2
10	5	1	4	2
Moyenne du score	**3,9**		**3**	
somme des rangs		**12**		**18**

L'odeur

	F p		**F EEB**	
Panélistes	**score**	**rang**	**Score**	**Rang**
1	4	1,5	4	1,5
2	4	1	2	2
3	2	2	3	1
4	3	1	1	2
5	5	1,5	5	1,5
6	2	2	4	1
7	5	2	6	1
8	4	1,5	4	1,5
9	3	1	2	2
10	2	1,5	2	1,5
Moyenne du score	**3,4**		**3,3**	
somme des rangs		**15**		**15**

La salinité

	F p		F EEB	
Panélistes	**score**	**rang**	**Score**	**Rang**
1	5	1,5	5	1,5
2	3	2	6	1
3	4	2	6	1
4	6	1	3	2
5	4	2	6	1
6	5	1,5	5	1,5
7	5	2	6	1
8	4	2	5	1
9	4	2	5	1
10	6	1,5	6	1,5
Moyenne du score	**4,6**		**5,3**	
somme des rangs		**17,5**		**12,5**

La dureté

	F p		F EEB	
Panélistes	**score**	**rang**	**Score**	**Rang**
1	5	2	6	1
2	2	2	5	1
3	1	2	4	1
4	2	2	5	1
5	5	1	3	2
6	3	2	4	1
7	6	1	1	2
8	3	1	1	2
9	5	1	1	2
10	5	1	4	2
Moyenne du score	**3,7**		**3,4**	
Somme des rangs		**15**		**15**