REPUBLIQUEALGERIENNEDEMOCRATIQUEET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université de Médéa

Faculté des sciences

Département de science de la nature et de la vie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Spécialité : ***Microbiologie Appliquée***

Thème :

Étude des propriétés physico-chimiques et sensorielles des fromages fabriqués à base de succédanés de présure d'origine microbienne et végétale

Présentée par :

- BEDDA Khadidja
- BOUKERRAS Bachira
- DAHMANI Houria

Soutenue publiquement le ……devant le jury :

Nom et prénom	*garde*	*statut*	*Etablissement*
Mr **BOUBAKRI.K**	MAA	Président	Université de Médéa
Mme **BOUCHIBANE.M**	MAB	Examinatrice	Université de Médéa
Mme **BOUMEDIENE.F**	MCB	Promotrice	Université de Médéa

Année universitaire 2023/2024

Remerciement

Je voudrais tout d'abord remercier grandement ma directrice, Madame ***Boumediene Farida****, pour toute son aide. Elle a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette mémoire. Je vous remercie pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail. J'ai eu le grand plaisir de travailler sous votre direction et ai trouvé auprès de vous une conseillère et un guide qui m'a reçu en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance. Votre compétence professionnelle incontestable ainsi que vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous. Vous êtes et vous serez pour nous l'exemple de rigueur et de droiture dans l'exercice de la profession.*

Nous tenons à remercier les membres du jury : ***Mr BOUBAKRI Kamel****, qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire, ainsi que* ***Mme BOUCHIBENE Malika,*** *qui a acceptée de juger ce travail.*

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

Nous tenons à remercier ***Mr DAHMANI Abdelkader*** *pour son aide et ses conseils durant toutes nos cursus universitaires.*

Nous exprimons également nos chaleureux remerciements à : tous les membres de laboratoire de SNV techniciens et ingénieurs surtout Mlle HANINI Lamia, sans oublier tous nos enseignants pour l'aide qu'ils nous ont apporté durant toute mon cursus universitaire, les travailleurs de la faculté de sciences et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie cet humble travail a :

*A mon cher père **AHMED ;** aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour ; l'estime. Le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi*

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

*A ma chère mère, honorable, aimable **ZINEB** tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence. La source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Ta prière et ta bénédiction m'ont été un grand secours pour mener a bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*A mon frère, mon bras droit **Abdelkader** et mes chère sœur **Amira** et **Amel** en témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affectation que je porte pour vous. Vous êtes toujours dans mon cœur. Je vous remercie d'être l'épaule sur laquelle je peux toujours compter.*

*A mes chère tantes Amel, Malika et Fatiha ; à tous les membres de la familles **BEDDA***

*A toutes les membres de la familles **DAAS** spécialement mon oncle Mohammed et sa femme kaltoum, à Zaki, Ahmed et Ishak, à mes tantes maternelle Farida, Samia et rafika.*

a Meriem, Fella et Anfel. Et tata Habiba

En particulier mes grand parents (Allah yarhamhoum).

*A mes chère trinome, **Bachira et Houria***

Pour ses ententes et ses sympathies.

A tous mes amies proches avec qui j'ai passé les meilleurs moments de ma vie et qui étaient toujours là dans mes pires moments, mon bras droit Dhikra, Amani, Amira, Zineb, Anfel, Nada, iman et Roumaissa, ainsi que Younes, Farouk, Adam, Akram et Abdel Mouhcine.

A toutes la promotion master 2 microbiologie appliquée. Et finalement pour tous ceux que j'ai omis de mentionne, tous ceux qui ont contribué de près et de loin qui me sont chers.

*Sans oublier Mme **BOUMEDIENNE Farida** pour toute son aide.*

Khadidja

Dédicaces

Grace à mon dieu…

A mes chers parents qu'ont toujours soutenu pour l'attende de mon objectif, pour le sens de devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance.

A mes chères sœurs et mon frère.

A tous mes amis et collègues que j'ai

pu connaitre depuis mon enfance et tous les étudiants de 2 -ème années master microbiologie appliquée.

A tous les professeurs qui m'ont enseigné tout au long de mon parcours, sans oublier surtout mon encadreuse ***Boumediene Farida*** *pour son précieux accompagnement, sa disponibilité et ses conseils avisés.*

A tous ceux qui m'aiment, A tous ceux que j'aime.

Je vous dédie ce modeste travail.

Bachira

Dédicaces

Je dédie ce projet de fin d'études à ceux qui m'ont accompagné et soutenu tout au long de cette aventure.

À ma mère et à mon père, pour leur amour inconditionnel, leur encouragement constant et leur foi en moi. Vous êtes mes piliers et ma source d'inspiration.

À mes sœurs et frères, pour leur soutien, leur patience et leur compréhension. Vous avez toujours été là pour moi et cela a fait toute la différence.

À tous mes amis proches avec qui j'ai passé les meilleurs moments de ma vie qui étaient toujours dans mes pires et plus heureux moments Ali, Meriem et Nesrine.

À mes collègues, Bachira et Khadidja pour leurs conseils et leur soutien tout au long de notre parcours commun. Travailler avec vous a été une expérience enrichissante et mémorable.

À mon encadrante Mme ***Boumediene Farida****, pour son précieux accompagnement, sa disponibilité et ses conseils avisés. Votre expertise et votre soutien ont été essentiels à la réalisation de ce projet.*

À tous, un grand merci du fond du cœur.

Houria

Résumé

Le développement de la production mondiale du fromage ces dernières décennies, ainsi que leur demande accrus a accentué les recherches de nouveaux succédanés de présure, indépendantes des conditions économico politiques, mais aussi des conditions sociales ou religieuses. L'étude que nous avons menée a porté sur l'évaluation des potentialités coagulantes et protéolytiques d'une protéase, produite par la culture d'une souche isolée localement *Bacillus subtilis* comparé à celle extraite à partir de fleur d'artichaut (*Cynara scolymus*). Dans un premier temps, l'isolement et l'identification par biologie moléculaire ont été réalisés sur une souche bactérienne, il s'agit de *Bacillus subtilis* BD17. Les propriétés biochimiques ont été démontrées sur les fromages produits. L'évaluation de certaines caractéristiques des protéases a révélé des activités coagulantes importantes ; des activités protéolytiques faibles et des indices AC/AP (Activité coagulante/Activité protéolytique) élevés pour les protéases d'origine microbienne et végétale. Les essais de fabrication de fromage type « pâte pressée non cuite » étaient menés à l'échelle expérimentale avec les extraits enzymatiques bruts d'origine microbienne et végétale et la présure commerciale, pour comparer les différents paramètres physico-chimiques et sensoriels. Les résultats obtenus après la comparaison des différents échantillons montrent qu'il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne les paramètres physicochimiques et le rendement fromager. L'évaluation sensorielle des fromages a révélé une texture, une couleur et un gout satisfaisants pour chaque fromage. Cependant, l'odeur du fromage fait à partir de l'EEBv (Extrait enzymatique brut végétale)est moins appréciée en comparaison avec les autres fromages, probablement du à l'odeur du végétal qui a affecté la qualité du produit élaboré.

Mots clés : présure ; protéase ; *Bacillus subtilis* ; *Cynara scolymus* ; fromage ; sensorielles.

Abstract

Abstract

The development of global cheese production in recent decades, along with the increased demand for cheese, has intensified the search for new rennet substitutes that are independent of economic and political conditions, as well as social or religious conditions. The study we conducted focused on evaluating the coagulating and proteolytic potentials of a protease produced by the culture of a locally isolated strain of Bacillus subtilis, compared to that extracted from artichoke flower (*Cynara scolymus*). Initially, the isolation and identification using molecular biology were performed on a bacterial strain, specifically *Bacillus subtilis* BD17. The biochemical properties were demonstrated on the produced cheeses. The evaluation of certain characteristics of the proteases revealed significant coagulating activities; low proteolytic activities ; and high AC/AP indices (coagulating activities / proteolytic activities) for the proteases of microbial and plant origin, respectively. The trials for making "uncooked pressed cheese" were conducted on an experimental scale using crude enzyme extracts of microbial and plant origin, as well as commercial rennet, to compare various physicochemical and sensory parameters. The results obtained after comparing the different samples show that there is no significant difference in terms of physicochemical parameters and cheese yield. The sensory evaluation of the cheeses revealed a satisfactory texture, color, and taste for each cheese. However, the smell of the cheese made from plant-based enzyme extract was less appreciated compared to the other cheeses, likely due to the plant odor affecting the quality of the final product.

Keywords : rennet ; protease ; *Bacillus subtilis* ; *Cynara scolymus* ; Cheese ; sensory

ملخص

تطوير إنتاج الجبن العالمي في العقود الأخيرة، إلى جانب زيادة الطلب عليه، قد عزز من البحث عن بدائل جديدة للمنفحة تكون مستقلة عن الظروف الاقتصادية والسياسية، وكذلك الظروف الاجتماعية أو الدينية.الدراسة التي أجريناها ركزت على تقييم الإمكانيات التخثرية والتحليلية لإنزيم البروتياز، الذي يتم إنتاجه من خلال زراعة سلالة محلية معزولة من *Bacillus subtilis*مقارنة بالإنزيم المستخرج من زهرة الخرشوف.(*Cynara scolymus*) في البداية، تم العزل والتحديد باستخدام علم الأحياء الجزيئي على سلالة بكتيرية وهي .*Bacillus subtilis* BD17 وقد تم إثبات الخصائص البيوكيميائية على الأجبان المنتجة.أظهرت قيم بعض خصائص إنزيمات البروتياز نشاطات تخثر مهمة ؛ ونشاطات تحليلية ضعيفة ؛ ومؤشرات AC/AP مرتفعة لإنزيمات البروتياز ذات الأصل الميكروبي والنباتي.تم إجراء تجارب صنع الجبن من نوع "العجين المضغوط غير المطبوخ" على نطاق تجريبي باستخدام مستخلصات إنزيمية خام ذات أصل ميكروبي ونباتي وكذلك المنفحة التجارية، لمقارنة مختلف المعايير الفيزيائية الكيميائية والحسية. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بعد مقارنة العينات المختلفة أنه لا يوجد فرق كبير فيما يتعلق بالمعايير الفيزيائية الكيميائية وعائد الجبن. وقد كشف التقييم الحسي للأجبان عن ملمس ولون وطعم مرضٍ لكل نوع من الأجبان. ومع ذلك فإن رائحة الجبن المصنوع من مستخلص الإنزيم النباتي كانت أقل تقديرًا مقارنة بالأجبان الأخرى، ربما بسبب رائحة النبات التي أثرت على جودة المنتج النهائي.

الكلمات المفتاحية: المنفحة ; البروتياز ; *Cynara scolymus*; *Bacillus subtilis*; الجبن ; الحسية.

Listes d'abréviations

AC : Activité coagulante.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AP : Activité protéolytique.

APs : Protéase aspartiques.

B.S.A : Sérum albumine bovine.

CCS : Comptage des cellules somatiques.

CFU/ml : Unité formatrice de colonie par millilitre.

DLC : Date limite de consommation.

DO : Densité optique.

EEB : Extrait enzymatique brut.

EEBm : Extrait enzymatique brut microbien.

EEBv : Extrait enzymatique brut végétale.

ESD : Extrait sec dégraissé.

EST : Extrait sec totale.

Fm : Fromage d'origine microbien.

Fp : Fromage d'origine présure commerciale

Fv : Fromage d'origine végétal.

GN : Gélose nutritive.

J.O: Journal officiel**.**

KDa: Kilodalton.

M : Mole.

MG : Matière grasse.

mg/ml : milligramme par millilitre.

MS : Moyenne des scores.

N : Normalité.

nm : Nanomètre.

P/V : Poids/volume.

PCA: Plate Count Agar.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

Pds : Poids.

Listes d'abréviations

R^2 : Coefficient de corrélation.

Rdt : Rendement fromager.

SR : Sommes des rangs.

TCA : Acide trichloracétique.

trs/min : Tours/minute.

UP : Unité de Présure.

US : Unité Soxhlet.

UV : Ultra -violet.

Listes des figures

Figure1: Observation microscopique après la coloration de Gram **14**

Figure 2: Étapes générales pour la fabrication de fromage **21**

Figure 3: example d'un fromage frais (Feta)) **22**

Figure 4: le reblochon **23**

Figure 5: fromage Beaufort **24**

Figure6: le camembert **25**

Figure 7: fromage saint-marcellin **25**

Figure 8: prélèvement d'un échantillon du sol à une profondeur de 10cm **29**

Figure 9: revivification de la souche **31**

Figure 10: fermentation au milieu semi-solide **33**

Figure 11: Protocole d'obtention de l'extrait enzymatique brut produit par la souche *Bacillus subtilis* BD17 **34**

Figure 12: : Coupe schématique d'un capitule d'artichaut *(Cynara scolymus)* **35**

Figure 13: Etapes d'obtention de l'extrait enzymatique brut de *Cynara scolymus.* **36**

Figure 14: schéma de la préparation de substrat de Berridge pour mesurer l'activité coagulante de l'extrait enzymatique. **38**

Figure 15: refroidissement du lait **41**

Figure 16: pasteurisations du lait **41**

Figure 17: Egouttage (séparation entre le caillé et le lactosérum) (photo originale 2024) **42**

Figure 19: Étapes générales de la fabrication de fromage à pâte pressée non cuite **43**

Figure 18: salage du fromage (photo originale 2024) **43**

Figure 20: mesure de l'extrait sec total à l'aide d'un dessiccateur **44**

Figure 21: (A) dégradation de caséine ; (B) : observation microscopique de la souche de Bacillus subtilis BD17 (photo originale ; 2024) **47**

Figure 22: teste de catalase + (photo originale ;2024) **48**

Figure 23: séquençage de la souche BD17. Error! Bookmark not defined.

Figure 24: arbre phylogénétique de la souche BD17. Error! Bookmark not defined.

Figure 25: Caractère apparent de l'extrait enzymatique brut. **52**

Figure 26: : Influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques obtenus **55**

Figure 27: Influence de la concentration en CaCl2 du lait sur l'activité coagulante relative de la Cynarase et l'extrait enzymatique microbien. **56**

Figure 28: Influence de la concentration en extrait coagulant sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques bruts **57**

Figure 29: Influence du pH du lait sur l'activité coagulante relative de la Cynarase et extrait enzymatique microbien **58**

Figure 30: Histogramme des résultats des analyses du texture des fromages fabriqués **64**

Figure 31: Histogramme des résultats des analyses d'arome des fromages fabriqués. **64**

Figure 32: Histogramme des résultats des analyses d'odeur des fromages fabriqués. **65**

Figure 33: Histogramme d'analyse statistique du paramètre sensoriel (goût de la pâte) des différents fromages fabriqué**s** **66**

Figure 34: Histogramme des résultats des analyses du couleur des fromages fabriqués. **66**

Listes des tableaux

Tableau 1 : Exemples de nouveaux produits à base de chymosine**. 5**

Tableau 2 : composition moyenne d'un fromage frais pour 100g de fromage **16**

Tableau 3: d'origine des fromages **20**

Tableau 4: Absorbance des différents MC Farland standard à 600 nm. **31**

Tableau 5: l'observation macro et microscopique **47**

Tableau 6: Conditions optimales de fermentation de la souche Bacillus subtilis BD17**49**

Tableau 7: Comparaison de l'AC de l'EEB aux autre AC des coagulases du genre Bacillus et de la présure bovine**. 49**

Tableau 8: Activité protéolytique et rapport AC/AP de l'EEB**. 50**

Tableau 9: Caractères apparents de l'extrait enzymatique brut. **51**

Tableau 10: Activité coagulante de l'extrait enzymatique brut des fleurs d'artichaut**52**

Tableau 11: Comparaison de l'AC de l'EEBv aux autre AC des coagulases d'origine végétale **53**

Tableau 12: Valeurs du rapport AC/AP des enzymes coagulant le lait de quelques plantes**54**

Tableau 13: Composition physico-chimique du lait utilisé dans la fabrication fromagère.**59**

Tableau 14: la composition physicochimique des trois fromages élaborés **60**

Tableau 15: résultats des analyses microbiologiques des trois fromages élaborés **62**

Tableau 16: récapitulatif des résultats de test de dégustations obtenus sur les fromages élaborés **63**

Table des matières

Introduction **1**

Chapitre ISynthèse bibliographique **3**

1. Présure 3

2. Les composants de la présure 4

2.1. La chymosine 4

3. Autres enzymes coagulant le lait 6

3.1. Les enzymes coagulantes d'origine végétale 7

3.2. Les enzymes coagulantes d'origine animale 8

3.3. Les enzymes coagulantes d'origine microbienne 9

3.3.1. Enzymes d'origine bactérienne 10

3.3.2. Enzymes d'origine fongique 11

4. Genre *Bacillus* 12

4.1. Intérêt industriel 14

5. Fromage 15

5.1. Définition 15

5.2. Composition du fromage 15

5.3. Fabrication de fromage 16

5.3.1. Coagulation du lait 16

*Coagulation par les enzymes 17

*Coagulation mixte 17

5.3.2. Égouttage 17

5.3.3. Salage 18

5.3.4. Affinage 18

6. D'origine de fromage 19

6.1. Fromages à base de coagulase d'origine végétale 19

6.2. Fromages à base de coagulase d'origine microbienne 20

7. Différents types de fromages 22

a) Fromage frais 22

b) Fromage à pâte pressée 22

 Fromages à pâte pressé non cuit 22

 Fromages à pâte pressé cuite 23

c) Fromage à pâte molle 24

 Fromage de pâte molle à croûte fleurie 24

- Fromage de pâte molle à croûte lavée 25

8. Propriétés sensorielles et organoleptiques de fromage 26
   - o Aspect 26
   - o Arome 26
   - o Texteur 27

Chapitre IIMatériels et méthodes 28

Lieu et période de travail 28

I. Matériel biologique 28

1. Méthode d'isolement de la souche 28
2. Identification de souche 29
3. Obtention de l'extrait enzymatique 30
   - Revivication de la souche 30
   - Préparation de l'inoculum 31
4. Préparation et inoculation du milieu de culture 32
   - 4.1. Méthode de préparation et d'inoculation du milieu de culture 32
   - 4.2. Conditions de fermentation 32
5. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut microbien (EEB_m) 33
   - 5.1. Extraction de l'enzyme coagulante 33

II. Matériel végétal 35

1. Matière première employée 35
2. Obtention et prétraitement des fleurs d'artichaut 35
   - 2.1. Extraction de l'enzyme brut végétal 35
3. Mesure des activités enzymatiques (microbienne et végétal) 37
   - Mesure de l'activité coagulante (AC) 37
   - Mesure de l'activité protéolytique 38
   - Détermination de l'indice AC/AP 38
   - Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique 39
4. Détermination des conditions optimales de l'activité coagulante 39
5. Caractéristiques de l'extrait enzymatique 39
   - Influence de la température 39
   - Influence de la concentration en $CaCl_2$ 39
   - Influence de la concentration en enzyme 39
   - Influence du pH 39

II. Essai de fabrication du fromage à pâte pressée non cuite par l'utilisation de l'EEB (microbien et végétal) 40
1. Etapes de fabrication du fromage 40
 Préparation du lait 40
1.1. Pasteurisation 40
2.2. Ensemencement du lait traité 41
2.3. Emprésurage 41
2.4. Egoutage et pressage 42
2.4. Le salage 42
3. Analyses physico-chimiques du fromage 44
 Mesure de pH 44
 Détermination de l'acidité 44
 Extrait sec total du fromage 44
 Matière grasse 44
 Extrait sec dégraissé (ESD) 44
 Rendement fromager 45
4. Analyse microbiologique du fromage 45
4.1. Objectif 45
5. Analyses sensorielles du fromage 45
Chapitre III Résultats et discussions **47**
I. Identification de la souche *Bacillus subtilis* BD17 47
1. Etude macro et microscopique 47
2. Teste catalase 48
3. Identification moléculaire de la souche *Bacillus subtilis* BD17 48
I. Résultats de l'extraction de l'extrait enzymatique d'origine microbienne 48
1. Production d'enzyme coagulant le lait 48
a. Conditions de fermentation 48
2. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut 49
2.1. L'Activité coagulante de l'EEB 49
2.2. Activité protéolytique, indice AC/AP et teneur en protéine de l'EEB 49
 Activité protéolytique et indice AC/AP microbienne 49
 Teneur en protéine de l'EEBm 50
II. Résultats de l'extraction de l'extrait enzymatique d'origine végétale (EEBv) 50
1. Matière première et extraction 50

2. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut 52
2.1. L'Activité coagulante de l'EEBv 52
2.2. Activité protéolytique de l'EEBv 53
2.3. Détermination du rapport AC/AP 54
3. Conditions optimales de l'activité coagulante des extraits enzymatiques 54
 Influence de la température sur l'activité coagulante de l'EEB 54
 Influence de la concentration en CaCl2 du lait 56
 Influence de la concentration en extrait enzymatique brut 57
III. Essai de fabrication d'un fromage à pâte pressée non cuite 59
1. Analyses physico-chimiques du lait cru utilisé 59
2. Analyses physico-chimiques du fromage élaboré type pâte pressée non cuit et le rendement fromager 60
a. Analyses physico-chimiques du fromage 60
b. Rendement fromager 61
IV. Les analyses microbiologiques 61
IIIV. Propriétés sensorielles des fromages 62
1. Résultats du test de dégustation 62
 Texture 64
 Arome 64
 Odeur 65
 Gout 66
 Couleur 66
..... 66
Conclusion 67
Références bibliographiques 67
Annexes 67

Introduction

Introduction

La fabrication du fromage est un processus complexe qui repose largement sur l'action de la présure pour coaguler le lait et former le caillé **(Hosseini et Varidi, 2021 ; Bravo Bolívar *et al.,* 2023)** Traditionnellement, la présure est une substance qui joue un rôle central en catalysant la dégradation des caséines **(Li *et al.,* 2023).**

La demande croissante de produits laitiers et de fromages a exacerbé la nécessité de disposer de quantités suffisantes de coagulants naturels. Cependant, la disponibilité limitée de la présure coagulante traditionelle d'origine animale pose un problème. Non seulement la présure est souvent coûteuse, mais sa consommation peut également être restreinte pour des raisons religieuses ou alimentaires. Cette réalité a incité l'industrie à explorer de nouvelles sources de protéases aux propriétés coagulantes pourraient être obtenu à partir de microbes comme les bactéries, les champignons **(Kahlouche et Nouani, 2017)** et de plantes **(Harboe, Broe et Qvist, 2010),** suscitant ainsi un intérêt croissant pour les substituts de présure **(Mazorra-Manzano *et al.,* 2013 ; Liu *et al.,* 2021).**

Aujourd'hui, les micro-organismes sont largement reconnus comme une source de protéases de haute qualité, lesquelles sont essentielles dans la fabrication de fromage. En effet, ils représentent la principale source de production de ces enzymes. Contrairement aux protéases obtenues à partir d'animaux et de plantes, celles produites par les micro-organismes offrent plusieurs avantages économiques et techniques. En plus de leur accessibilité économique, les micro-organismes se distinguent par leur remarquable diversité biochimique et la possibilité de les manipuler génétiquement. Ces caractéristiques font des micro-organismes des candidats privilégiés pour la production d'enzymes protéolytiques de qualité supérieure, répondant ainsi aux besoins de l'industrie fromagère **(Laxman *et al.,* 2005).**

De plus, certaines plantes contiennent des enzymes coagulantes, telles que les extraits aqueux de fleurs de cardon *Cynara scolymus*, qui sont utilisés depuis des années comme coagulant du lait dans la fabrication de fromages **(Ben Amira *et al.,* 2017).** Cette diversité de sources et de types d'enzymes souligne le large éventail de possibilités offertes par les protéases végétales dans divers domaines biotechnologiques.

Les caractéristiques biochimiques attrayantes et le potentiel biotechnologique des protéases végétales ont motivé la recherche visant à identifier ces enzymes chez différentes

espèces de plantes sauvages **(Moreno-Hernández *et al.*, 2017).** Alors que la plupart des protéases purifiées à partir de plantes sont classées comme protéases aspartiques, des activités de coagulation du lait ont également été observées chez les protéases à cystéine et à sérine **(Shah, Mir et Paray, 2014).**

Au fil du temps, l'action harmonieuse et variable des enzymes et des microorganismes, coordonnée au long de l'affinage ou de maturation du fromage et ses saveurs distinctives. Cette métamorphose représente le passage d'un aliment à un produit compact, caractérisé par une longue durée de conservation et avec une haute valeur nutritive qui répond aux besoins nutritionnels fondamentaux, Il a été prouvé que le fromage, quel qu'il soit, était l'aliment le plus riche en principes nutritifs**(Ferreiro and Rodríguez-Otero, 2018 ; Zhi et al., 2018**), puisque, à poids égal, il est environ dix fois plus nourrissant que la meilleure viande de bœuf en raison de sa richesse en protéines, matière grasse, calcium, attirant ainsi l'attention de tous les groupes d'âge. **(Collin, 2015).**

Cette étude est censée démontrer l'intérêt d'utiliser les deux extraits enzymatiques d'origine microbienne et végétale ; examinés comme alternatives à la présure traditionnelle dans la fabrication de fromages, ainsi que d'analyser les propriétés biochimiques et sensorielles des fromages obtenus en comparaison avec ceux fabriqués à l'aide de présure commerciale.

• Ce mémoire est décrit en deux parties :

Premier partie, une revue bibliographique générale aborde la présure ainsi que ses alternatives d'origine végétale et microbienne. Les microorganismes impliqués dans la production fromagères. Le fromage et ses compositions ; les différents types de fromage ; l'origine de fromage ainsi que le processus de fabrication fromagère.

Une seconde partie qui énonce le matériel et les méthodes utilisés à fin d'atteindre les objectifs de l'extraction et la caractérisation des enzymes coagulantes ainsi que les essais de la fabrication fromagère. Cette partie se termine par l'interprétation et la discussion des résultats obtenus. Enfin, une conclusion générale résume l'ensemble du travail précédent.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

1. Présure

La présure est un extrait du quatrième estomac (caillette ou sac de présure) des ruminants, principalement des veaux et des bovins adultes, ayant la capacité de coaguler le lait par action enzymatique. Les enzymes extraites de la caillette sont la chymosine méniale et la pepsine et celles-ci sont produites dans les cellules glandulaires de la muqueuse. La présure est le nom familier donné à l'enzyme extraite de l'estomac qui coagule le lait. En raison de la disponibilité limitée d'estomacs appropriés pour la production de présure et des pertes économiques importantes résultant de l'abattage des jeunes veaux, les fromagers ont cherché d'autres moyens de coaguler le lait **(Aly, 2012)**, tels que extraits de certaines plantes, de microorganismes et de différents ruminants tels que l'agneau et la chèvre **(Balabanova et Vlaseva, 2017)** Les propriétés rhéologiques et sensorielles du fromage sont liées à l'activité enzymatique**(Ben Amira *et al.,* 2017)** . Les substituts de présure doivent présenter une activité protéolytique modérée pour garantir la qualité du produit, car une protéolyse excessive pourrait conduire à une diminution du rendement lors du processus de fabrication du fromage. La dénaturation de la κ-caséine présente dans le lactosérum qui va provoquer un goût amer dans le produit final. **(Fox, 2015)**

La coagulation enzymatique du lait constitue une étape essentielle dans le processus de fabrication du fromage, et son exécution repose sur l'action cruciale de la présure **(Hosseini et Varidi, 2021 ; Bravo Bolívar *et al.,* 2023**). La présure et ses substituts appartiennent à la famille des aspartyl protéases, agissant en tant qu'endopeptidases **(Abdella, Ahmed et Ibrahim, 2023).** Cette substance, composée d'enzymes protéolytiques et lipolytiques telles que la chymosine, la pepsine et la lipase, joue un rôle central en catalysant la dégradation des caséines, spécifiquement au niveau de la K-caséine **(Li *et al.,* 2023)**. L'activité enzymatique de la présure induit le clivage des protéines du lait, provoquant ainsi la déstabilisation des micelles de caséine qui forment une matrice protéique tridimensionnelle connue sous le nom de caillé, une composante fondamentale dans la production du fromage.

Ainsi, au-delà de son rôle fondamental dans la coagulation enzymatique du lait, la présure émerge comme un élément clé influençant la texture, la structure, et les caractéristiques sensorielles distinctives des fromages due à la libération d'acides aminés pendant ce processus enzymatique agit comme précurseurs pour des réactions cataboliques subséquentes qui donnant lieu à la production de composés aromatique **(Fox *et al.,* 2017).**

En raison de son faible pouvoir protéolytique et de son efficacité élevée dans la coagulation du lait, la chymosine est particulièrement bien adaptée à la production fromagère. Les substituts les plus pertinents pour répondre aux exigences de la fabrication de fromage proviennent de sources microbiennes, végétales et d'enzymes recombinantes. Actuellement, le marché propose quatre types de présure : la présure de veau, la chymosine recombinante, la présure végétale et la présure microbienne. **(Shah, Mir et Paray, 2014)**

2. Les composants de la présure

2.1. La chymosine

L'enzyme de coagulation du lait la plus spécifique est la chymosine, la chymosine est une enzyme digestive protéolytique qui possède une activité de coagulation du lait élevée et une faible activité protéolytique générale, Dérivée traditionnellement de la caillette des jeunes veaux. Elle est synthétisée sous forme de prochymosine, activée sous l'action du suc gastrique. Qui est le principe actif de la présure, est un agent important de coagulation du lait utilisé dans la fabrication des fromages**. (Luerce, 2014).** Il clive la liaison Phe105-Met106 de la protéine du lait κ-caséine, Ce clivage par la chymosine divise le κ-CN en para-κ-CN et en glycomacropeptide (GMP), réduit la stabilisation électrostatique et stérique des micelles de caséine, initie ainsi l'agrégation des micelles de caséine et déclenche la coagulation du lait. **(Langholm Jensen *et al.,* 2013 ; Li *et al.,* 2024).** La protéolyse provoquée par la chymosine lors de la fabrication et de l'affinage du fromage contribue à la texture, et indirectement à l'arôme et à la saveur du fromage Cheddar affiné. **(Li *et al*., 2024).**

La chymosine est une holoprotéine, de poids moléculaire de 40 kDa ; il coagule le lait de manière optimale à pH 6,0-6,4 et à 20-30°C dans une réaction en deux étapes, bien que le pH optimal de l'enzyme soit d'environ 4 ; La température optimale pour la coagulation est environ 40°C ; il est inactivé à pH 7,5 et est dénaturé à pH 8. L'inactivation thermique a lieu dès 50°C, elle est totale à 61°C. **(Esteves *et al.,* 2003).**

Le génie génétique a été utilisée pour la production commerciale d'un produit à base de chymosine pure à 100 % des microbes. Ce type de chymosine est souvent appelée chymosine produite par fermentation. La chymosine fermentaire résulte le clonage du Gène de prochymosine obtenu à partir de jeunes veaux est transféré via Intervention des plasmides d'ADN dans les cellules microbiennes. Les microbes utilisés pour ce type de présure

comprennent Micro-organismes non pathogènes *Escherichia coliK12, Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* et *Aspergillus niger var. Awamori*. **(Hui, 2006).**

Cette approche représente une perspective prometteuse pour la création d'enzymes applicables dans le secteur laitier.

Tableau 1 : Exemples de nouveaux produits à base de chymosine (Hui, 2006).

Nom du produit	Entreprise et type
Américain pur	Sanofi Bio-Industries Présure de veau purifiée par échange d'ions
Chy-max	Fermentation Pfizer (maintenant Chr. Hansen) – à l'aide d'*Escherichia coli*K-12
Chymogène	Chr. Fermentation Hansen - Utilisation d'*Aspergillus niger var. Awamori*
ChymoStar	Fermentation Rhône-Poulenc (maintenant Danisco) - À l'aide d'*Aspergillus niger* var. Awamori
Maxiren	Gist-BroGist-Brocades Fermentation—À l'aide de *Kluyveromyces marxianus var. lactiscades* Fermentation—À l'aide de *Kluyveromyces marxianus var. lactis*

Il existe trois génétiques variantes de la chymosine, A, B et C, où la variante B est le dominant (fréquence allélique 50%) et le C variante la plus rare (10%) dans les extraits d'estomac bovin. Un seul résidu d'acide aminé différencie la variante A de chymosine du variant B, alors qu'il n'y a pas toujours des informations sur la séquence d'acides aminés primaires du la plus récente variante C trouvée de la chymosine. Selon le dernier rapport, la chymosine A, avec l'acide aspartique en position 244, a une activité spécifique de coagulation du lait environ 50 % plus élevée que la chymosine B, qui a la glycine en position 244. Malgré la différence dans l'activité spécifique de coagulation du lait entre les variantes A et B, elles sont toutes deux considérées comme ont les mêmes propriétés fromagères**. (Andrén, 2011)**

2.2. La pepsine

Enzyme protéolytique du suc gastrique rompant certaines liaisons peptidiques des protéines, sécrété par les cellules glandulaires de l'estomac sous une forme inactive, le pepsinogène **(Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine).** La pepsine considérée comme identique à la présure, a reçu une attention considérable en remplacement de la présure dans la fabrication du fromage **(Emmons *et al*., 1971).** L'acide chlorhydrique, qui est naturellement présent dans les sucs digestifs, garantit l'activation du pepsinogène en pepsine de 36 kDa.**(Osuna-Ruíz *et***

***al*., 2023).** La détermination de l'activité de la pepsine est basée sur la méthode officielle ISO 11815. **(EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP) *et al.*, 2023)**. Lors de l'ingestion d'aliments, la pepsine a pour effet de rompre les liaisons entre les peptides et les protéines. Les polypeptides divisent ces derniers en petits morceaux.

A l'opposé de la chymosine, la pepsine possède une activité protéolytique élevée et une faible activité coagulante. D'après **(Moschopoulou *et al.*, 2006)** pepsine est largement utilisé dans la fabrication du fromage (Cheddar, Emmental…). La pepsine est relativement stable à des pH compris entre 5 et 5,5. Son activité enzymatique est plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat. **(Miranda *et al.*, 1989).** Le pH protéolytique général optimal de la pepsine à environ 2 , Comparée à la chymosine qui a son pH protéolytique général optimal est 3,8, mais il a une activité spécifique élevée de coagulation du lait au niveau pH du lait soit 6,7. l'activité de coagulation du lait de 1 mg de chymosine correspond à celle de environ 5 mg de pepsine à pH 6,7. Comme c'est le cas pour toutes les préparations enzymatiques, l'activité protéolytique de la présure est significativement influencée par les facteurs environnementaux, en particulier le pH et la température. Son niveau d'activité optimal se situe à pH 5,5 et à une température de 42°C. En dehors de ces valeurs, l'activité diminue rapidement, atteignant zéro aux environs de 0°C et vers 65°C.**(Andrén, 2011).**

3. Autres enzymes coagulant le lait

Depuis 1961, la quantité de fromage produite dans le monde a augmenté. Mais comme il y a moins d'estomacs de veau disponibles, il y a moins de présure disponible. Il y a environ 50 ans, l'offre d'enzymes coagulantes a commencé à ne plus répondre à la demande et aujourd'hui, la présure de veau ne peut fournir que 20 à 30 % du total. Ainsi, la nécessité de rechercher des alternatives à la présure de veau se fait sentir. En tant qu'alternatives à la présure de veau, les enzymes de coagulation du lait animales, les enzymes d'origine végétale **(Mazorra-Manzano *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2019)**, et les enzymes d'origine microbiennes **(Ahmed *et al.*, 2016 ; Zhang *et al*., 2019)** se sont récemment révélées avoir une valeur commerciale significative dans le processus de fabrication du fromage **(Liu *et al.*, 2021 ; Wehaidy *et al.*, 2023).**

3.1. Les enzymes coagulantes d'origine végétale

Les protéases d'origine végétale constituent un substitut prometteur à la présure animale dans la fabrication de fromages, d'aliments (tels que les produits laitiers innovants, les attendrisseurs de viande et les hydrolysats de protéines) et de produits pharmaceutiques (tels que les médicaments anti-inflammatoires et digestifs). **(Fguiri *et al*., 2021).**

Les enzymes coagulantes sont extraites par macération, de divers organes de plantes supérieures. **(Shah, Mir et Paray, 2014)**. Parmi ces espèces :on peut citer l'ananas *ananas comosus* **(Catianeo *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 1997)** le figuier *Ficus carica* **(Moodie ; 2001 ; Baeyens-Volant *et al*., 2015)**et le papayer *Carica papaya* **(Mitchel, Chaiken et Smith, 1970; Adetunji et Salawu, 2008).** Malheureusement, toutes ces enzymes ont été considérées comme inadaptées car elles engendrent un fromage extrêmement amer en raison de leur forte activité protéolytique.**(Mohamed Ahmed *et al.*, 2009 ; Fguiri *et al.*, 2021).**

Une exception pour les extraits de fleurs de Genre Cynara et, en particulier, de *Cynara scolymus* et de *Cynara cardunculus* qui contiennent une multiplicité de protéases aspartiques de différentes formes moléculaires.(**Llorente *et al*., 2014).** En effet, les fleurs séchées du cardon *Cynara cardunculus* ont été utilisées de manière réussie pendant plusieurs siècles***(Sarmento et al.*, 2009).**Les trois protéases aspartiques dans les extraits de *C. cardunculus*, initialement nommée cynarase 1–3 (cyprosine B correspondante à la cynarase 3)**(Sampaio, Pais et Fonseca, 2014)**, ont été identifiés comme glycoprotéines dimériques qui diffèrent par la taille de leur sous-unités et l'activité de la coagulation du lait. D'une part, l'extrait de cette variété a été utilisé pendant longtemps dans la production des fromages artisanaux de lait de brebis. **(Abellán *et al.*, 2012 ; Ordiales *et al.*, 2012)** . D'autre part, cette coagulase est largement employée en Portugal et en Espagne dans la préparation de certaines variétés de fromages traditionnels tels que Serra da Estrela, La Serena et Los Pedroches…**(Roseiro *et al.*, 2003; Liburdi *et al.*, 2018).**

Dernièrement, on a observé un changement notable d'intérêt vers les coagulants provenant de légumes, comme les protéases, que l'on trouve dans différents tissus végétaux comme les fleurs de cardon, les artichauts *Cynara scolymus* **(Sarmento *et al.*, 2009 ; Llorente *et al.*, 2014)** et les fleurs de *Citrus aurantium* .Ces tissus végétaux contiennent des enzymes appelées protéases, qui ont la capacité d'hydrolyser les caséines du lait à différents niveaux de pH et de température. **(Nicosia *et al.*, 2022).**

Pour ce qui concerne *C. scolymus*, l'activité protéolytique maximale à pH 5,0 ainsi que son inactivation par chauffage modéré, rendent cet extrait brut de protéase potentiellement utile pour la production de fromage**. (Chazarra *et al.*, 2007 ; García *et al.*, 2015)**

Une étude portant sur l'optimisation des conditions d'extraction d'une protéase à partir de *Cynara cardunculus*, réalisée par **(Ben Amira *et al.*, 2017)** a révélé que les conditions optimales d'extraction, conduisant à une activité de coagulation du lait de (9,550 U.A.C/ml), étaient les suivantes : temps de broyage de 30 secondes, pH de 3, temps d'extraction de 50 minutes et un rapport solide/liquide de 15 g/100 ml. Sur le plan technologique, les résultats indiquent que l'extrait de *C. cardunculus* présente une excellente efficacité sur le lait cru en termes de fermeté du gel par rapport à la chymosine, ainsi qu'un bon temps de gélification. Par conséquent, la présure optimisée de *C. cardunculus* pourrait être utilisée comme agent de coagulation du lait efficace.

Récemment, au cours d'une étude portant sur une protéase extraite du fruit de tamarillo (*Cyphomandra betacea* Cav.), il a été démontré que cette enzyme atteignait son activité optimale à un pH de 11 et à une température de 60°C. Le séquençage a fortement suggéré que la protéase appartient à la famille des protéases à sérine alcaline, similaire à la subtilisine. Cette protéase issue du tamarillo a été nommée tamari line.**(Li *et al.*, 2018).**

En raison de leur activité protéolytique élevée, qui conduit à la génération de saveurs amères, de leur accessibilité et de leur facilité de purification, les agents de coagulation du lait issus de plantes utilisées dans l'industrie fromagère connaissent un intérêt croissant. De plus, la demande d'interdiction des aliments génétiquement modifiés et leur acceptation croissante parmi les végétariens et certains groupes religieux sont favorisées par l'utilisation de protéases végétales dans la production de fromage.**(Fguiri *et al*., 2021).**

3.2. Les enzymes coagulantes d'origine animale

Les enzymes coagulantes d'origine animale ou les protéases aspartiques gastriques sont des enzymes protéolytiques retrouvées chez tous les organisme**s** comme le chameau **(Wangoh, Farah et Puhan, 1993) ;** les viscères de poissons **(Osuna-Ruíz *;* 2023**). Les espèces porcine, ovine, bovine, avicole et aquatique sont ses principales sources. **(Benyahia Krid et Aissaoui Zitoun, 2016)**. Ces enzymes démontrent une capacité comparable à induire la coagulation du lait, transformant ainsi le lait liquide en une masse coagulée nécessaire à la formation du fromage. De plus, leur activité protéolytique, la capacité à décomposer les protéines du lait en

peptides et en acides aminés, est également similaire à celle de la présure. Au niveau du tube digestif, elles sont responsables de la digestion des protéines alimentaires par hydrolyse des liaisons peptidiques. **(Beckers, 2005)**.

Les protéases gastriques sont fréquemment utilisées comme enzymes de coagulation animale ; La présure, composée principalement de chymosine ou de pepsine, est le type le plus largement utilisé. Selon la Fédération internationale du lait, la « présure » est un terme utilisé pour décrire un extrait coagulant obtenu à partir de la caillette de jeunes ruminants tués avant leur sevrage. Il comporte deux fractions actives : la pepsine constitue une fraction mineure et la chymosine constitue une fraction substantielle. Grâce à son ciblage spécialisé des κ-caséines, l'activité protéolytique de la présure animale augmente la production de fromage tout en diminuant les pertes de protéines lors de la coagulation. Le type de présure le plus utilisé pour coaguler le lait destiné à la fabrication du fromage est la présure de veau. Il y a environ cinquante ans, l'offre de présure animale a commencé à ne plus répondre à la demande. Actuellement, seuls 20 à 30 % des besoins en présure des veaux peuvent être satisfaits.**(Hachana, Aloui et Fortina, 2021).**

3.3. Les enzymes coagulantes d'origine microbienne

Les recherches visant à trouver des substituts ont conduit au développement d'un certain nombre de coagulants microbiens.**(Garg et Johri, 1994)**. Les microorganismes sont une excellente source de protéases, qui sont des enzymes responsables de la dégradation des protéines en acides aminés. Les protéases sont largement utilisées dans diverses applications industrielles telles que l'alimentation, la production de biocarburants, la fabrication de produits pharmaceutiques et chimiques, ainsi que dans le domaine de la recherche. Les micro-organismes sont les principaux producteurs en raison de leurs avantages économiques et techniques, outre leur diversité biochimique et la possibilité de manipulation génétique.**(Laxman *et al.*, 2005 ; El-Tanboly *et al.*, 2013).** Effet, les protéases d'origine microbienne, et en particulier celles issues de microorganismes génétiquement modifiés, ont démontré des performances prometteuses et positives. **(Badgujar et Mahajan, 2014).** L'industrie fromagère a également montré beaucoup d'intérêt pour la production réussie d'enzymes coagulantes à partir de cultures microbiennes.**(Hachana, Aloui et Fortina, 2021).**

Il existe Beaucoup de protéases extracellulaires d'origine microbienne agissent de façon similaire que la chymosine et sont, en partie, adaptées à la production de fromage ; comme les

protéases aspartiques produites par *Rhizomucor miehei* et *Rhizomucor pusillus*, qui ont une structure tridimensionnelle similaire à la chymosine.**(Hachana, Aloui et Fortina, 2021).** L'enzyme de Rhizomucor miehei est le coagulant microbien le plus couramment utilisé pour la production fromagère et est disponible à différents degrés de thermo-stabilité et de pureté. **(Jacob, Jaros et Rohm, 2011).**

En effet, la première génération de protéases fongiques a été confrontée à un inconvénient majeur, à savoir une stabilité thermique élevée. Pour remédier à cette limitation, des approches telles que les modifications chimiques **(Smith, Billings et Yada, 1991)** et les techniques de génie génétique ont été employées pour réduire la stabilité thermique de ces enzymes**(Yamashita *et al.*, 1994)**. Ces modifications ont ouvert la voie à la production réussie de fromages affinés de haute qualité en utilisant des coagulants fongiques modifiés**.**

3.3.1. Enzymes d'origine bactérienne

La maturation du fromage peut être accélérée par les enzymes de coagulation du lait microbiens car ils ont une sélectivité de substrat distincte et une activité protéolytique généralement plus élevée. **(Sarwar, 2019).**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, Bacillus polymyxa*) **(Zhang, Qiao et Zhang, 2021)** et Pseudomonas qui ont été plus particulièrement explorés**(Green, 1977)**. Bacillus sp. P45, isolé de l'intestin du poisson (*Piaractus mesopotamicus*) originaire du bassin amazonien**(Sirtori *et al.*, 2006)**, produit une enzyme qui présente un grand potentiel pour l'hydrolyse des protéines**(Daroit, Corrêa et Brandelli, 2009).** Il a été démontré que l'ajout de présure *Bacillus subtilis* K-26 au fromage cheddar accélère la formation d'acide, réduit la quantité de protéines et de graisses et augmente la quantité d'azote soluble pendant le processus d'affinage. Par rapport au fromage fabriqué avec de la chymosine de chameau recombinante, le fromage Cheddar allégé à base de présure *Rhizomucor miehei* a démontré une protéolyse plus rapide. **(Sarwar, 2019).**

Récemment, des souches de Bacillus non pathogènes ont démontré leur capacité à produire efficacement des enzymes coagulantes de lait. Parmi celles-ci, on peut citer *Bacillus licheniformis* 5A5 **(Ahmed et Helmy, 2012)** , *Bacillus subtilis* natto **(Wu *et al.*, 2013)**, *Paenibacillus spp* souche BD3526**(Hang *et al.*, 2016)**,*Bacillus stearothermophilus***(Ahmed *et***

***al*., 2016)**, *Bacillus subtilis* MTCC 10422**(Kumari Narwal *et al*., 2016)**, ainsi que *Bacillus sp*. P45 **(Lemes *et al*., 2016).**

Dans une étude menée par **(Wehaidy *et al*., 2018)** visant à améliorer la stabilité thermique d'une coagulase produite par *Bacillus subtilis* KU710517 en la couplant de manière covalente à certains polysaccharides oxydés, ainsi qu'à évaluer le polysaccharide le plus approprié pour la stabilisation des enzymes, les chercheurs ont observé que parmi tous les conjugués, l'enzyme liée au polyéthylène glycol (PEG) présentait la plus haute activité retenue (551 U/mg de protéine) avec une activité récupérée de 95,3%. L'énergie d'activation de l'enzyme conjuguée au PEG a été estimée à 24,56 KJ.mol-1, une valeur inférieure à celle de la protéine native (29,27 KJ.mol-1).

Par ailleurs, l'optimisation des facteurs de production et la caractérisation d'une souche bactérienne (*Bacillus subtilis* AU-2) isolée à partir de l'intestin de *Tribolium castaneum*, réalisées par **Patel*et al.*, (2019)** ont révélé une production significative de protéase (580 U/ml). Cette production a été obtenue dans un milieu (g/L) composé de 10 g de tourteau de soja, 7,5 g de glucose, 1,0 g de KH_2PO_4, 1,0 g de $CaCl_2$, maintenu à un pH de 7,0, en utilisant une culture discontinue à une vitesse de 60 tr/min et une température de 37 °C pendant 48 heures. La purification de l'enzyme en trois étapes a conduit à une protéase purifiée 26,81 fois, atteignant une activité spécifique de 22773 U/mg et une récupération de 34%. La protéase extracellulaire purifiée de *B. subtilis* AU-2 présente une masse moléculaire de 38 kDa. Elle a été identifiée comme une métallo-protéase, montrant une optimale activité à un pH de 7,5 et une température de 40 °C.

3.3.2. Enzymes d'origine fongique

La plupart des coagulants microbiens couramment utilisés dans la fabrication du fromage proviennent généralement de sources fongiques.**(Law et Tamime, 2011).**

Garg et Johri, (1994) ont identifié plus de 100 sources microbiennes. Les protéases microbiennes de *Rhizomucor miehei, Rhizomucor pusillus et Cryphonectria parasitica* sont actuellement obtenues**. (Yegin et Dekker, 2013).** Ils ont été construits pour permettre une production à grande échelle en cours d'utilisé pour la publicité et dans la production de fromage. **(Jacob, Jaros et Rohm, 2011).**

Rhizomucor miehei produit la protéase aspartique, qui est le coagulant microbien le plus fréquemment utilisé dans la production de fromage **(Jacob, Jaros et Rohm, 2011).** Cette enzyme est thermolabile.

Cependant, de nombreuses recherches se sont concentrées sur la production, la purification et la caractérisation des protéases générées par des souches spécifiques, qu'elles soient bactériennes ou fongiques**(Ozturkoglu-Budak *et al*., 2016)**. Ces études visent généralement à évaluer le potentiel des enzymes pour des applications particulières. Dans le contexte des applications laitières, les sources microbiennes sont examinées en vue de trouver des substituts aux enzymes, en raison de leur stabilité accrue et de leur coût relativement inférieur.

En effet, plusieurs chercheurs ont indiqué l'efficacité des protéases d'origine fongique dans le processus de coagulation du lait, notamment celles provenant de *Mucor sp*. Et *Rhizomucor sp*. **(Yegin *et al.*, 2011 ; Leite Júnior, Tribst et Cristianini, 2015)** . Diverses protéases aspartiques d'origine fongique ont été purifiées et caractérisées en tant que substituts de présure **(Mandujano-González *et al*., 2016)**. Les enzymes de type pepsine comprennent l'aspergillopepsine (aspergillopepsine I, EC3.4.23.18) chez les espèces d'*Aspergillus* **(Vishwanatha, Appu Rao et Singh, 2009)**et la rhizopuspepsine (EC3.4.23.21) pour les espèces de *Rhizopu*s **(Kumar *et al.,* 2005)**. Ces enzymes ont des poids moléculaires situés entre 30 et 50 kDa et présentent des résidus d'acide aspartique conservés sur le site actif **(Mandujano-González *et al*., 2016).**

Da Silva *et al.*, (2017), lors d'une analyse approfondie des propriétés biochimiques de la peptidase aspartique sécrétée par le champignon *Phanerochaete chrysosporium*, ont démontré que cette coagulase présente des caractéristiques qui en font un candidat prometteur pour être utilisé dans la production de fromage.

4. Genre *Bacillus*

Cellules en forme de bâtonnet, droites ou légèrement courbées, isolées ou par paires, certaines en chaînes, et parfois sous forme de longs filaments. Des endospores se forment, pas plus d'une par cellule ; ces spores sont très résistantes à de nombreuses conditions défavorables. Gram positif, ou Gram positif uniquement dans les premiers stades de croissance, ou Gram négatif. Le type de réticulation directe par la muréine Ameso-DAP est le plus courant, mais le L-Lys-D-Glu, l'Orn-D-Glu et le L-Orn-D-Asp ont parfois été rapportés. Aérobies ou anaérobies facultatifs, mais quelques espèces sont décrites comme strictement anaérobies. L'accepteur

d'électrons terminal est l'oxygène, remplaçable par des alternatives chez certaines espèces. La plupart des espèces se développent sur des milieux de routine tels que la gélose nutritive et la gélose au sang. Morphologie et taille des colonies très variables entre et au sein des espèces. Une grande diversité de capacités physiologiques est exposée, allant du psychrophile au thermophile, et de l'acidophile à l'alcaliphile ; Certaines souches sont tolérantes au sel et d'autres sont halophiles. La catalase est produite par la plupart des espèces. Oxydase positive. **(Logan et Vos, 2015)**

La classification classique des bacilles se fait généralement en fonction de leur morphologie et de la position de la spore, divisant ainsi ces organismes en trois groupes distincts :

Groupe I : Ce groupe comprend les bacilles à Gram positif, qui ont une spore centrale ou terminale, sphérique ou ovoïde, sans déformation de la cellule hôte. Il est subdivisé en deux sous-groupes :

- Le sous-groupe IA, composé de bacilles ayant un diamètre supérieur à 1 mm et contenant des inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate (tels que *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides, Bacillus thuringensis*).

- Le sous-groupe IB, qui rassemble des bacilles d'un diamètre inférieur à 1 mm et ne possédant pas d'inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate (par exemple *Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus…*).

Groupe II : Ce groupe est constitué d'espèces à Gram variable, caractérisées par une spore ovoïde, centrale ou terminale, qui déforme la cellule hôte (comme *Bacillus circulans, Bacillus stearothermophilus*).

Groupe III : Ce groupe se compose de bacilles à Gram variable présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou sub-terminale (par exemple *Bacillus globisporus, Bacillus insolitus*...).

Ces classifications sont essentielles pour étudier et comprendre la diversité des bacilles et leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques. **(Logan et Vos, 2015)**

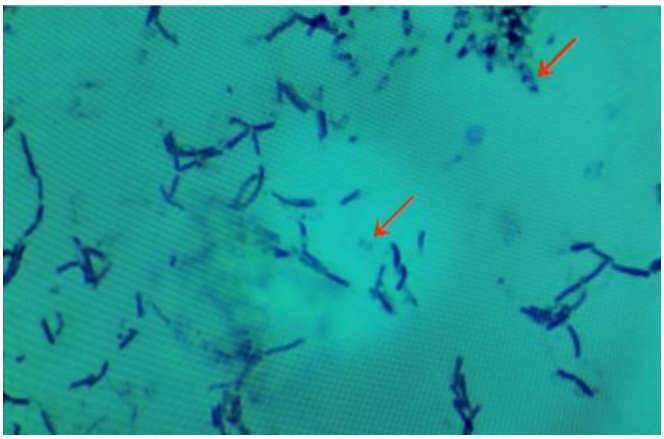


Figure1: Observation microscopique après la coloration de Gram **(Lu, Guo *et* Liu, 2018)**

4.1. Intérêt industriel

L'évolution significative du genre Bacillus dans le domaine de la production d'enzymes industrielles découle des caractéristiques remarquables de ce groupe. Ces micro-organismes se distinguent par leur facilité de culture et leur adaptabilité optimale aux exigences de développement industriel. Leur potentiel génétique est particulièrement remarquable : ils sont présents dans une diversité d'habitats et démontrent une variété de types trophiques, allant des psychrophiles aux mésophiles, en passant par les thermophiles, les neutrophiles, les acidophiles et les alcanophiles.

De plus, ils sécrètent une quantité substantielle de protéines enzymatiques à l'extérieur de leurs cellules. Notamment, ces enzymes exocellulaires appartiennent à la famille des hydrolases, qui a connu un développement considérable pour ses applications industrielles, comprenant notamment les amylases et les protéases. **(Schallmey, Singh et Ward, 2004)**

5. Fromage

5.1. Définition

Selon le Codex Alimentarius**(Codex Alimentaire,2013),** le fromage est un produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou semi dure, dure dans lequel le rapport protéine de lactosérum/caséine ne dépasse pas celui du lait **(Carr *et al.*, 2002)**, obtenu par coagulation complète ou partielle des protéines du lait, du lait écrémé, du lait partiellement écrémé, de la crème, de la crème de lactosérum ou du babeurre, grâce à l'action de la présure ou d'autre agents coagulants appropries et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation.**(Guetouache et Guessas, 2015).**

Le but de l'industrie fromagère est de transformer le lait en un produit d'utilisation prolongée et de goût différent grâce à diverses actions microbiennes et enzymatiques **(Leroy et De Vuyst, 2004).**

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

5.2. Composition du fromage

Les fromages représentent un groupe alimentaire très hétérogène dont la constitution est très variable selon la qualité de la matière première utilisée ou selon la technique de fabrication .Le fromage est très riche de part de sa composition, en protéines, eau, peptides bioactifs, acides aminés, lipides, acides gras, vitamines et minéraux **(Walther *et al.*, 2008)**

Tableau 2 :composition moyenne d'un fromage frais pour 100g de fromage **("Fromage frais nature - Campagne de France - 100 g," 2016)**

Constituants	Quantité en (g)
Glucide	**07.70**
Eau	**80**
Protéine	**09.30**
Calcium	**80**
Lipides	**0**
Sodium	**40**
Vitamine en UI	**170**

5.3. Fabrication de fromage

La production de fromage consiste en l'assemblage des protéines du lait, principalement de la caséine qui retient les autres composants, puis en l'assemblage de morceaux de caillé moulés. Une circulation de la phase liquide liée à l'agglomération, qui comprend l'eau du lait et les éléments solubles, qui sont emprisonnés dans des pores avant d'être libérés. Les trois étapes de la fabrication sont la coagulation du lait (formation d'un gel de caséines), l'égouttage (déshydratation partielle du gel) qui donne lieu à un caillé et enfin le salage. Il s'agit de ces étapes pour les fromages frais. Le reste des fromages subissent en plus une étape d'affinage, ce sont les fromages affinés **(Luquet, 1990).**

5.3.1. Coagulation du lait

La coagulation du lait joue un rôle essentiel**(Lenoir, 1985)** pour la production du fromage, ce processus correspond à une modification physico-chimique des micelles de caséine sous l'action d'enzymes protéolytiques et/ou d'acide lactique. Celle-ci entraine la formation d'un réseau protéique tridimensionnel appelé coagulum ou gel. Les mécanismes proposés dans la formation du coagulum diffèrent totalement selon que ces modifications sont induites par acidification ou par actions d'enzymes coagulantes ou encore par l'action combinée des deux **(Gastaldi-Bouabid, 1994).**

***Coagulation par acidification**

Composition de lait est aptitude à l'acidification par voie fermentaire. La capacité du lait à s'acidifier par fermentation à l'aide de lactobacilles naturellement présents dans le lait et/ou ajoutés volontairement sous forme de cultures encore appelées les bactéries lactiques qu'est une condition préalable à la capacité du lait à coaguler par acidification **(Ramet, 1993).**

***Coagulation par les enzymes**

Il y a un grand nombre d'enzymes protéolytiques, d'origine animale, végétales ou microbienne, qui ont la propriété de coaguler le complexe caséique. Traditionnellement, le coagulant de choix est la présure, dérivé de la caillette des jeunes ruminants nourris au lait, dont le principal ingrédient actif est la chymosine mélangée avec la pepsine aussi des sources fongiques telles que *Rhizomucor meihei* **(Bennett et Johnston, 2004).**

***Coagulation mixte**

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. Cette méthode est utilisée pour l'obtention de fromages frais et de fromages à pâte molle (camembert) **(Mahaut *et al*.,2000)**

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

5.3.2. Égouttage

L'égouttage du coagulum est un phénomène dynamique qui se fait de manière spontanée. Il conduit à la concentration de certains constituants du coagulum par phénomène physique de rétraction (synérèse), qui s'accompagne de l'expulsion passive du lactosérum liée à la porosité et à la perméabilité du coagulum. L'évacuation du lactosérum conduit à la formation du caillé **(Colin-Schoellen, 1990; Mateo *et al*., 2009).**l'élimination du lactosérum dépend du type de coagulation mis en jeu et sa porosité. Le coagulum lactique est plus perméable tandis que les coagulums emprésurés doivent subir des actions mécaniques (brassage, tranchage, pressage) et physique (cuisson) pour permettre leur égouttage **(Everard *et al.*, 2008).** La texture finale de la pâte fromagère est directement liée aux mécanismes de coagulation et de l'égouttage utilisés lors de la fabrication **(Almena-Aliste et Mietton, 2014).**

5.3.3. Salage

Le salage est une étape indispensable à la fabrication des produits affinés. Il s'effectue après le démoulage et permet de compléter l'égouttage, de contribuer à la formation de la croûte et au développement des propriétés sensorielles.

Cette opération permet aussi de diminuer l'activité de l'eau à l'intérieur du produit fini **(Schroeder *et al.*, 1988; Mistry et Kasperson, 1998),** car l'absorption du sel dans la matrice fromagère engendre une migration des molécules d'eau vers la surface afin d'équilibrer la pression osmotique entre la phase aqueuse de l'aliment et le milieu salé. De façon générale, la perte d'eau est de 2 à 2,5 fois plus grande que la quantité de sel absorbée (p/p).

Le salage du fromage est une étape qui conditionne l'aspect et le goût futur du fromage. Le sel joue un rôle très important dans le sens où il :

-Confère son aspect et une grande partie de son arôme

-Il solidifie la croûte, ce qui permet au fromage de garder la forme

-Il a un effet régulateur des échanges entre la pâte et l'atmosphère

-Le sel étant un conservateur naturel, il permet une meilleure conservation du fromage

-Les propriétés du sel permettent au fromage de lutter contre les microbes et les bactéries**.**

5.3.4. Affinage

C'est l'étape la plus complexe et la plus longue de la fabrication des fromages affinés qui détermine les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de chaque produit fini **(Bennett et Johnston, 2004).** C'est un processus biochimique complexe et long qui correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé par les différents agents d'affinage : les enzymes endogènes du lait, les enzymes coagulantes (présure, enzymes microbiennes), microflore lactique originaire ou non, des levains, microflore non lactique et la flore fongique. Ces diverses réactions biochimiques donneront les caractéristiques organoleptiques et texturales du fromage **(McSweeney, 2004)**. La durée d'affinage varie selon le type du fromage, elle dure quelques semaines à deux ans ou plus, sous des conditions appropriées pour chaque fabrication **(Fox *et al.*, 2005).**

6. D'origine de fromage

6.1. Fromages à base de coagulase d'origine végétale

L'évolution de la fabrication artisanale de fromages met en lumière l'usage traditionnel de divers extraits de plantes en tant que coagulants pour le lait, même en présence d'une forte activité protéolytique. **(Jacob, Jaros et Rohm, 2011, Shah, Mir et Paray, 2014, (Ben Amira *et al*., 2017) ;** Les enzymes extraites des cardosines de *Cynara cardunculus* représentent un exemple notable ayant abouti à la production commerciale de fromages, grâce à leurs propriétés distinctives de goût et de texture (**Rooijen *et al*., 2008)** Une variété de fromages confectionnés à partir de diverses sources de lait et utilisant ces protéases végétales est désormais disponible à l'échelle mondiale. L'Espagne et le Portugal sont particulièrement actifs dans la production de différentes variétés de fromages utilisant ces enzymes. **(Roseiro *et al*., 2003 ; Chazarra *et al.*, 2007 ; Shah, Mir et Paray, 2014).**

En raison du succès rencontré par certaines enzymes dans la fabrication traditionnelle de fromages à travers le monde, des expériences ont été menées au cours des dernières décennies pour créer d'autres types de fromages. Des recherches portant sur les extraits de *Cynara cardunculus L*. et de *Cynara humilis L*. ont révélé, en raison de leur composition enzymatique similaire, que pratiquement toutes les propriétés rhéologiques étaient semblables pour les deux coagulants. En comparaison avec la chymosine, ces derniers se sont avérés légèrement plus protéolytiques, ce qui a entraîné la formation d'un gel moins rigide**. (Esteves, Lucey et Pires, 2002).**

Hashim *et al.* (2011) ont démontré l'impact de l'extrait de *Zingiber officinale* sur les caractéristiques physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles du fromage Peshawari, élaboré à partir de lait de vache, en le comparant à celui obtenu avec de la présure. Seules les concentrations en azote soluble et en humidité ont révélé des variations significatives. Le fromage coagulé avec l'enzyme du *Zingiber officinale* a affiché des niveaux d'humidité plus bas et des concentrations en azote soluble plus élevées par rapport à celui coagulé avec de la présure. Aucune note d'amertume n'a été relevée dans le fromage fabriqué avec l'extrait *de Zingiber officinale.*

Dans les pays méditerranéens, les fleurs de cardon *Cynara cardunculus* sont employées dans la confection de fromages artisanaux traditionnels en raison de la présence de protéases aspartiques (APs) dans ces plantes. Un coagulant issu de *C. cardunculus* est utilisé comme présure dans la production de fromages à partir de laits de brebis et de chèvres de haute qualité,

tandis que les fromages élaborés à partir de lait de vache présentent souvent un goût excessivement amer. **(Meribai *et al*., 2017).**

6.2. Fromages à base de coagulase d'origine microbienne

Lemes *et al*. (2016) Ils ont examiné la capacité d'une protéase à coaguler le lait obtenu à partir de *Bacillus sp*. P45 et ont utilisé cette enzyme pour fabriquer un fromage à la crème enrichi en farine de chia et de quinoa. Le fromage développé avait une forte rétention d'eau (≥ 99,0%), ce qui entraînait une faible synérèse. Les résultats montrent que le produit fabriqué à l'aide de l'enzyme était en bonne santé et que ses caractéristiques technologiques démontrent une grande stabilité et une viabilité du produit.

Dans une recherche portant sur la comparaison de l'impact de deux protéases fongiques, l'une commercialisée (*Rhizomucor spp*) et l'autre produite en laboratoire (*Thermomucor indicae-seudaticae* N31), sur la composition, le rendement et les caractéristiques sensorielles du fromage de type "Prato". Aucun effet significatif n'a été observé par ces auteurs pour les différents paramètres étudiés entre les deux coagulants. **Alves *et al*. (2013).**

Tableau 3: d'origine des fromages

Fromage d'origine végétale	**Fromage d'origine bactérienne**
Tofu**(Zee *et al.,* 1987)**	Gouda **(Decadt *et al.,* 2024)**
Daiya**(Dobson et Marangoni, 2023)**	Feta **(Gatzias *et al.,* 2020)**
Violife**(Liu *et al.,* 2023)**	Emmental **(Pluta-Kubica *et al.*, 2021)**
Tofutti **(Coward *et al.,* 2002)**	Cheddar **(Mofredj *et al.,* 2007)**

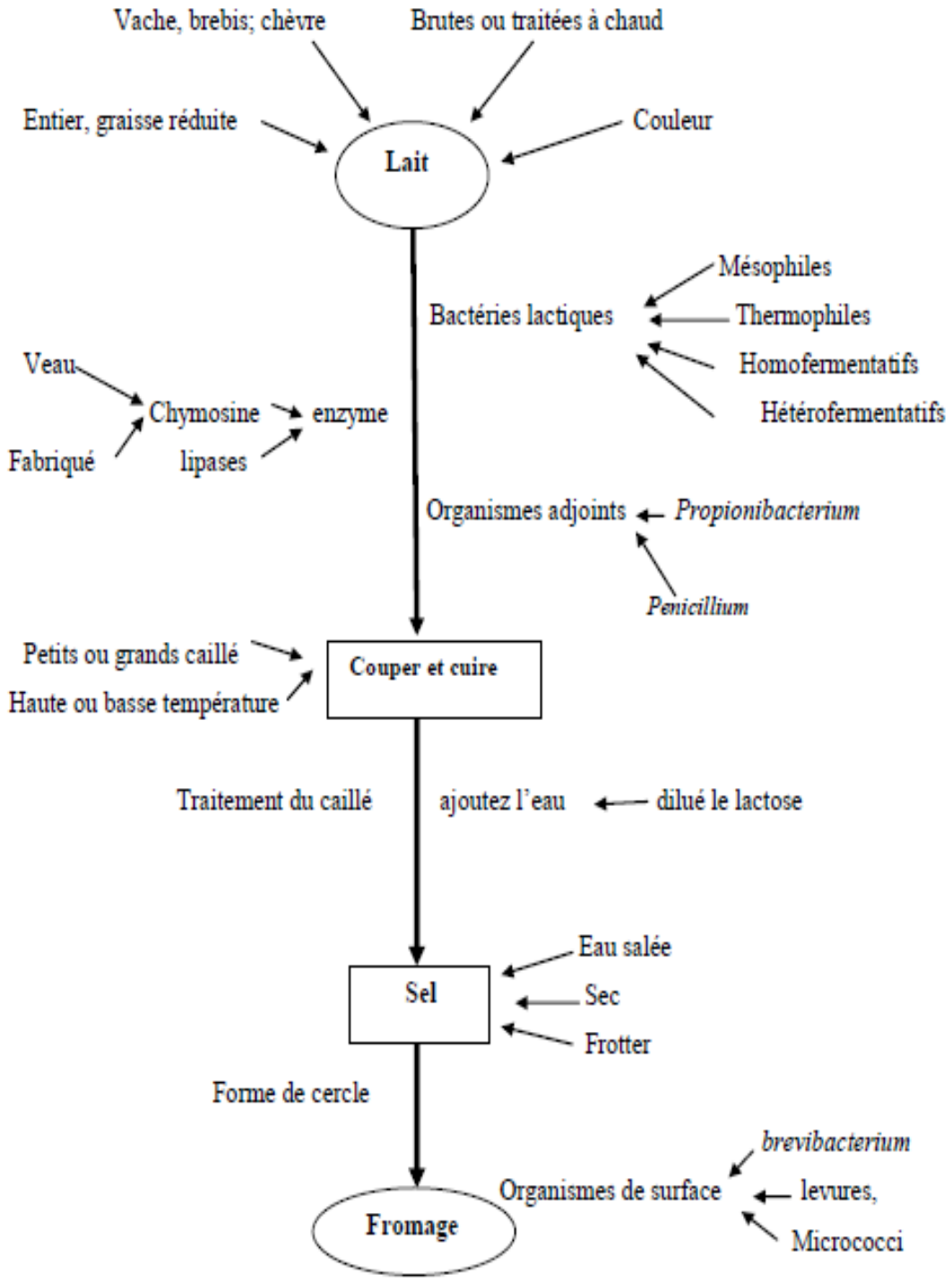


Figure 2: Étapes générales pour la fabrication de fromage **(Robert ,2006)**

7. Différents types de fromages

a) Fromage frais

Les fromages frais se distinguent par leur processus d'égouttage lent, qui sont réalisés à partir de laits ou de crèmes qui sont adaptés à la consommation. Ils sont le fruit de la coagulation lactique dominante du lait, qui associe souvent l'action des ferments lactiques à celle de la présure. Ces fromages se distinguent par le fait qu'ils ne subissent pas d'affinage après les étapes d'égouttage et de moulage. La DLC de tous les fromages frais est de 24 jours**(Mahaut *et al.*, 2000. Luquet et Corrieu, 2005).**

Les produits de fromage frais comprennent une grande diversité en termes de teneur en matière grasse (allant de 0 à 60% par rapport à l'extrait sec), tandis que la matière sèche totale dépasse les 15%. Il est essentiel qu'ils conservent une flore vivante lors de la vente au consommateur **(Luquet et Corrieu, 2005)**.



Figure 3: example d'un fromage frais (Feta))**("Product Focus Truth, Lies and Feta The Cheese that Launched a (Trade) War," 2009)**

b) Fromage à pâte pressée

- **Fromages à pâte pressé non cuit**

Les fromages à pâte pressée non cuite ou demi-ferme, qui sont affinés pendant une période assez longue dans une atmosphère fraîche et très humide, présentent une consistance dense et une pâte d'un jaune pâle. Il est important que ces fromages ne soient ni desséchés, ni trop faibles,

et que la pâte près de la croûte ne soit pas plus foncée. Ils renferment une humidité allant de 40 à 60 %.(***Le Guide des aliments*, 1999) .**



Figure 4: le reblochon **(Plas, 2023)**

- **Fromages à pâte pressé cuite**

Les fromages à pâte pressée cuite ou pâte dure sont des fromages où le caillé est chauffé à une température de 65°C après le pressage. Ensuite, laissé à l'épuration. Le mot "cuite" fait référence à un fromage dont le caillé est chauffé lors de son tranchage. Lorsqu'il est chauffé à environ 65°C, le lait ne détruit qu'une partie de la flore. Lorsqu'il est pasteurisé, le lait est chauffé de 72 à 85°C pendant un maximum de 20 secondes, puis refroidi immédiatement à 4°C.La dégradation de la flore naturelle présente dans le lait entraîne une nécessité de réensemencement en flore standardisée, ce qui peut être bénéfique pour les industriels en leur offrant un goût et une texture régulières **(Majidi ,2009.)**



Figure 5: fromage Beaufort **(Auboiron et Lansard, 1997)**

c) Fromage à pâte moelle

Le Codex Alimentarius **(Codex Stan A-6-1978, révisé 1-1999, amendé 2001)** définit les fromages à pâte molle comme étant tous les fromages dont la teneur en eau après élimination des matières grasses dépasse 67 %. Ils sont des fromages affinés et dont la pâte n'est ni cuite ni pressée, produits à partir de lait pasteurisé ou de lait cru de chèvre, de vache ou de brebis. La pâte de ces fromages est généralement crémeuse et onctueuse, avec une légère élasticité. Deux types de croûte peuvent être développés sur les fromages à pâte molle, ce qui permet de diviser cette famille en deux sous-familles : les pâtes molles à croûte fleurie et les pâtes molles à croûte moyenne.

- **Fromage de pâte molle à croûte fleurie**

Il se distingue par une croûte blanche à dorée recouverte d'un duvet de moisissures blanc et feutré appelé fleur qui se forme pendant l'affinage, ce qui lui donne son nom (croûte fleurie). La présence du champignon Penicillium candidum à la surface des fromages en début d'affinage explique cette duveteuse de la croûte. **(Pradal, 2012)** (par exemple camembert (**Huynh, 2023)**



Figure6: le camembert **(Huynh, 2023)**

- **Fromage de pâte molle à croûte lavée**

La pâte molle à croûte lavée est fabriquée selon le même principe que les pâtes molles à croûte fleurie, à la différence que le caillé est coupé plus ou moins finement avant d'être moulé. Selon le degré de séchage, ce rompage facilite le déplacement du petit lait : la pâte sera plus étroite, plus compacte mais reste néanmoins moelleuse, coulante ou plus ferme. Pendant la période d'affinage, qui dure de deux à quatre mois, le fromage est régulièrement retourné, puis brossé ou lavé avec une saumure additionnée de bière, d'hydromel, de vin ou d'eau de vie, ce qui participe à la formation de ses différentes caractéristiques. Il dévoile des saveurs intenses ou marquées, parfois intenses **(*Le Guide des aliments*, 1999).**



Figure 7: fromage saint-marcellin **(Fromager, 2017)**

8. Propriétés sensorielles et organoleptiques de fromage

Selon sa définition, l'analyse sensorielle implique l'étude des caractéristiques gustatives des produits à l'aide des organes de sens. Les fromages possèdent différentes caractéristiques organoleptiques telles que leur apparence, leur texture et toutes les sensations olfacto-gustatives (odeur, arôme, saveur et sensations trigéminales). La forme d'un fromage, sa teinte, son parfum, sa texture, sa saveur, son arôme stimulent les sens tels que la vue, l'ouïe, le toucher, l'odorat et le goût, entraînant des réactions plus ou moins intenses d'acceptation ou de rejet.**(Bennett et Johnston, 2004)**

Une grande diversité de fromages est produite dans toutes les régions du globe. Les fromages sont prisés en raison de leur importance nutritionnelle et de leur composition alimentaire complexe et diversifiée. La qualité alimentaire des fromages est déterminée par les caractéristiques sensorielles, qui sont principalement perçues par les sens humains lors de leur consommation. On peut définir ces propriétés comme des caractéristiques visuelles, des caractéristiques gustatives et des caractéristiques texturales **(Drake et Delahunty, 2017).**

Il est essentiel d'effectuer une évaluation sensorielle afin d'évaluer l'impact des caractéristiques sensorielles sur la qualité du fromage et son acceptabilité par le consommateur. Toutefois, la complexité du fromage pose un véritable défi pour son appréciation sensorielle. Dans ce chapitre, nous nous pencherons sur la façon dont les caractéristiques sensorielles sont perçues, les bénéfices et les désavantages des méthodes d'évaluation sensorielle**(Irlinger et Mounier, 2009)(Drake et Delahunty, 2017).**

- **Aspect**

Les pigments liposolubles, notamment les caroténoïdes, sont responsables de la couleur 0des produits laitiers tels que le beurre et le fromage. Ces pigments ne sont pas synthétisés par les animaux, mais plutôt obtenus par le pâturage des ruminants grâce à la consommation de diverses espèces végétales**(Martin *et al.*, 2009)**

- **Arome**

La fermentation lactique est à l'origine de l'acidité de pratiquement tous les fromages. On peut trouver les composés aromatiques des exemples de diacétyle produit par des bactéries dans la formation d'arômes dans le fromage frais **(Walstra *et al.*, 2005).**

L'odeur typique d'une variété de fromage est un mélange complexe de substances chimiques qui dégagent des odeurs et des saveurs. Quant à l'arôme, ce sont principalement des bactéries,

naturellement présentes dans le lait, qui en sont responsables ou qui sont ajoutées en tant que culture bactérienne lors de la fabrication du fromage. La température et l'humidité durant la période de maturation influencent les différents types de bactéries qui sont favorisés lors de la maturation du fromage, ce qui entraîne la production d'un mélange de substances aromatiques**.(Walther *et al.*, 2008)**

- **Texteur**

L'évaluation sensorielle des propriétés de la texture du fromage joue également un rôle important dans ce domaine. Mordre dans un fromage et mâcher un morceau permet de se prononcer par rapport à sa fermeté, sa friabilité ou son élasticité en bouche. **(McSweeney, 2004).**

Selon l'étude **de Bárcenas *et al.* (2005),** l'analyse sensorielle est un outil important qui permet la différenciation de fromages de différents laits et principalement ceux de l'appellation protégée. Elle peut être un moyen de classification des fromages.

Chapitre II
Matériels et méthodes

Lieu et période de travail

Les travaux de notre partie expérimentale (extraction des protéases microbienne et végétale et l'isolement de la souche bactérienne) ont été effectués au sein de laboratoire de microbiologie au niveau de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Yahia Farés de Médéa pendant une période allant de mois de février jusqu'à mois de mai. Ainsi, l'identification de la souche microbienne a été réalisée au niveau de l'entreprise Life Gene sciences de Sidi Bel Abbés. Les analyses physico-chimiques et microbiologiques du lait et des différents échantillons du fromage fabriqués à base des extraits enzymatiques bruts d'origine microbienne et végétale ont été effectués au sein de laboratoire de la laiterie Arib Ain Defla pendant une période de dix jours.

I. Matériel biologique

1. Méthode d'isolement de la souche

Une souche isolée par l'équipe de recherche du département de Sciences de la Nature et de la Vie, Université Yahia Farès Médéa. La terre utilisée pour la recherche des microorganismes a été prélevée à proximité de la laiterie Bousken commune de Beni Slimane Wilaya de Médéa (c'est une terre qu'a été riche au lactosérum).Une petite quantité de sol 10g a été mélangée avec 90 ml d'eau physiologique stérile pendant 20 minutes pour obtenir une dilution initiale (10^{-1}). On a effectué des dilutions en série pour chaque échantillon. On a étalé un échantillon de 0,1 ml de la dilution appropriée à 10^{-9} sur un milieu d'agar de comptage de plaques (PCA) contenant 2% (p/v) d'agent antifongique l'**Amidase** pour prévenir la croissance des champignons et 12% (p/v) de lait écrémé en poudre stérile.

Les plaques ont été incubées à 30°C pendant 48h pour l'énumération de la protéase coagulant le lait produisant une souche caséolytique par la présence d'un halo clair autour de la colonie. Les colonies ayant des différences de morphologies distinctes telles que la couleur (technique de Gram) **(Annexe1),** la forme et la taille ont été sélectionnées et purifiées par rayures en utilisant le même milieu. Avant de préparer le stock, le pouvoir coagulant de tous les isolats a été vérifié et examiné au microscope avant les préparations du stock. Les isolats bactériens Gram positifs pré-identifiés comme *Bacillus subtilis* ont été purifiés et les souches sélectionnées montrant une activité coagulante ont été maintenues par conservation sur gélose.



Figure 8: prélèvement d'un échantillon du sol à une profondeur de 10cm

2. Identification de la souche

La macroscopie et la microscopie ont été réalisées sur des boîtes de Petri contenant des plaques d'agar PCA (Plate Count Agar) sur des colonies âgées de 24 heures. Pour l'analyse de séquençage, l'ADN génomique a été extrait de la souche parle kit d'extraction d'acides nucléiques GF-1 (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Selangor, DE, Malaisie) conformément aux recommandations du fabricant. L'ADN isolé a été conservé à 4 °C pour la PCR.

L'amplification de l'ADNr 16S a été réalisée par une technique de PCR, en utilisant de l'ADN polymérase Taq, l'ADN génomique comme modèle et des amorces universelles à 3 et 5inversées.

Le mélange réactionnel de PCR contenait 50 µl de mélange maître comprenant 1,25 U de Hot Start Taq DNA Polymerase (Solis Biodyne, Estonie), 25–50 ng/µl de matrice d'ADN, 0,3 µM de chaque amorce, 1,5 µM de MgCl2 (Chlorure de magnésium) (Solis Biodyne, Estonie), et de l'eau distillée pour atteindre un volume de réaction de 50 µl. Le processus de PCR comprenait les étapes suivantes :

- Dénaturation initiale à 94 °C pendant 12 minutes.
- Dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes.
- Hybridation à 55 °C pendant 30 secondes.
- Extension à 72 °C pendant 1 minute et 40 secondes.

Le processus d'amplification a été répété pour 30 cycles, suivi d'une extension finale à 72 °C pendant 7 minutes. La PCR a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur (iCycler Bio-Rad, USA). La concentration d'ADN a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (NanoDropTM 2000, USA).

Après la réaction de PCR, le produit de la PCR a été séparé en utilisant un gel d'agarose à 1,5 % (Sigma-Aldrich, USA) par électrophorèse sur gel d'agarose. Une échelle d'ADN de 100 paires de bases (Solis Biodyne, Estonie) a été utilisée comme marqueur de poids moléculaire de l'ADN. L'électrophorèse a été réalisée à 80 V pendant 1 heure et 30 minutes. Le gel a ensuite été visualisé sous lumière UV après coloration avec Midori Green Advance (Nippon Genetics, Japon) et examiné à l'aide d'un Trans illuminateur UV.

Les produits de PCR ont été séquencés par la technique de Sanger dans les conditions optimisées par Gene Life Sciences.

3. Obtention de l'extrait enzymatique

- **Revivification de la souche**

La souche conservée à 04 °C sur un milieu gélose incliné a été repiquée sur les boites de gélose nutritive et incubée à 30 °C pendant 24h.

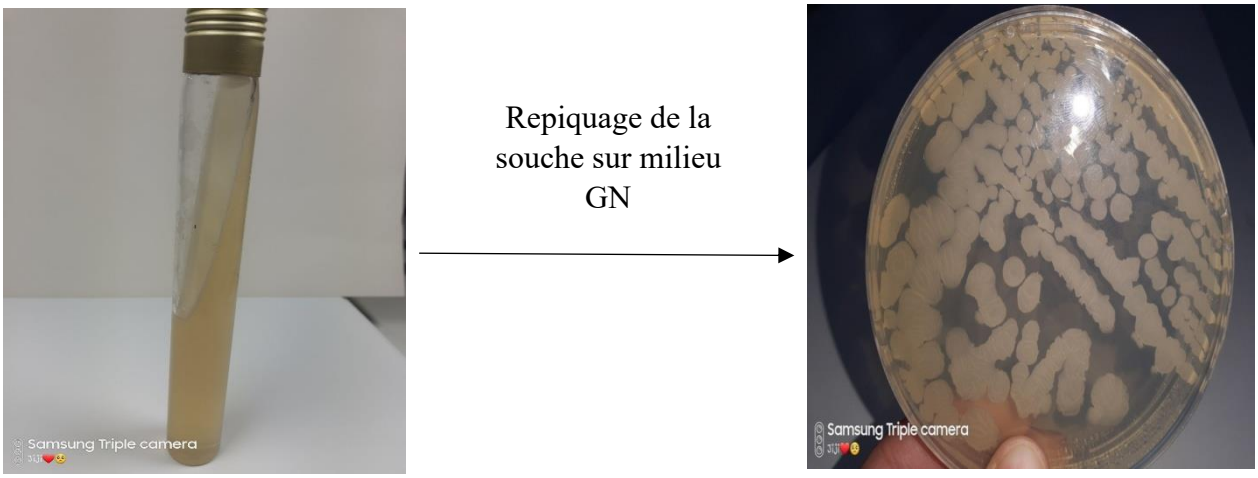


Figure 9: revivification de la souche

- **Préparation de l'inoculum**

La souche est activée par incubation à 30°C pendant 24 heures. Puis elle est submergée de solution stérile d'eau physiologique (5 ml dans un tube à essai). A l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose nutritive afin de mettre en suspension les bactéries. Ensuite, la suspension est ajustée au standard Mc Farland 5 à l'aide d'un spectrophotomètre UV Visible, ce qui correspond à une densité optique (DO) de 0.9 nm à une longueur d'onde de 600 nm. Le 5 Mc Farland est équivalent à 15 x10^8CFU/ml. Le nombre de bactéries est vérifié par un dénombrement sur milieu coulé (P.C.A) en boite de pétri.

Tableau 4: Absorbance des différents MC Farland standard à 600 nm.

MC Farland	**Standard**	**0.5**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Absorbance	/	0.08-0.1	0.257	0.451	0.582	0.669	0.9
Approx. Cell density (1 x 10^8 CFU/mL)	/	1.5	3	6	9	12	15

3. Préparation et inoculation du milieu de culture

Le milieu de culture sélectionné pour la fermentation est un milieu semi-solide composé de son de blé, comme recommandé par **Rao et Mathur, (1975).** Il favorise la synthèse de protéases extracellulaires et garantit une production élevée de métabolites. Il y a 50g/l de son de blé, 3g/l d'extrait de levure, 4g/l de glucose, 2g/l de caséine et 3g/l de Na_2HPO_4 dans ce milieu. On a mentionné que le son de blé est un environnement parfait pour la production de protéase par les microorganismes **(Hang *etal.*, 2016).**

3.1. Méthode de préparation et d'inoculation du milieu de culture

On distribue le son du blé dans des Erlenmeyers de 250 ml en ajoutant 2,5 g de levure, 0,2 g de glucose, 0,1 g de caséine et 0,1 g de Na_2HPO_4 dans 50 ml d'eau distillée. Les erlenmeyers sont enveloppés de coton cardé enveloppé dans un filet de gaze et recouverts de papier aluminium (qui garantit une bonne étanchéité et résiste aux températures élevées). Ensuite, ils sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes, puis on insère 3 ml de l'inoculum dans chaque erlenmeyer. L'incubation se déroule à une température de 30°C pendant 24 heures, avec une agitation moyenne de 110 tours/min **(Poza *etal.*, 2003).**

3.2. Conditions de fermentation

Une recherche sur les conditions de fermentation de l'enzyme a été menée sur le terrain de culture suggéré par **Rao et Mathur, (1975)** afin d'améliorer le temps de coagulation, il est possible d'augmenter la concentration de l'extrait coagulant et de réduire le temps de coagulation. Nous avons effectué six essais avec trois répétitions pour chaque essai dans le but d'optimiser la quantité du son de blé et le temps d'incubation.

- **Essai n °1** : 2.5g de son du blé, temps d'incubation 24 h ;
- **Essai n °2** : 2.5g de son du blé, temps d'incubation 48 h ;
- **Essai n °3 :** 2.5g de son de blé, temps d'incubation 72h ;
- **Essai n °4 :** 5g de son de blé, temps d'incubation 24h ;
- **Essai n °5 :** 5g de son de blé, temps d'incubation 48h ;
- **Essai n °6 :** 5g de son de blé, temps d'incubation 72h ;



Figure 10: fermentation au milieu semi-solide

4. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut microbien (EEB_m)

4.1. Extraction de l'enzyme coagulante

Pour obtenir l'extrait enzymatique brut, il est nécessaire de commencer par filtrer le contenu des erlenmeyers incubés sur gaze dans une hôte stérile, stockée sur un entonnoir. Ensuite, le filtrat est soumis à une centrifugation à 4000 trs/min pendant une durée de 30 minutes à 4°C (**Rao et Mathur, 1975)**

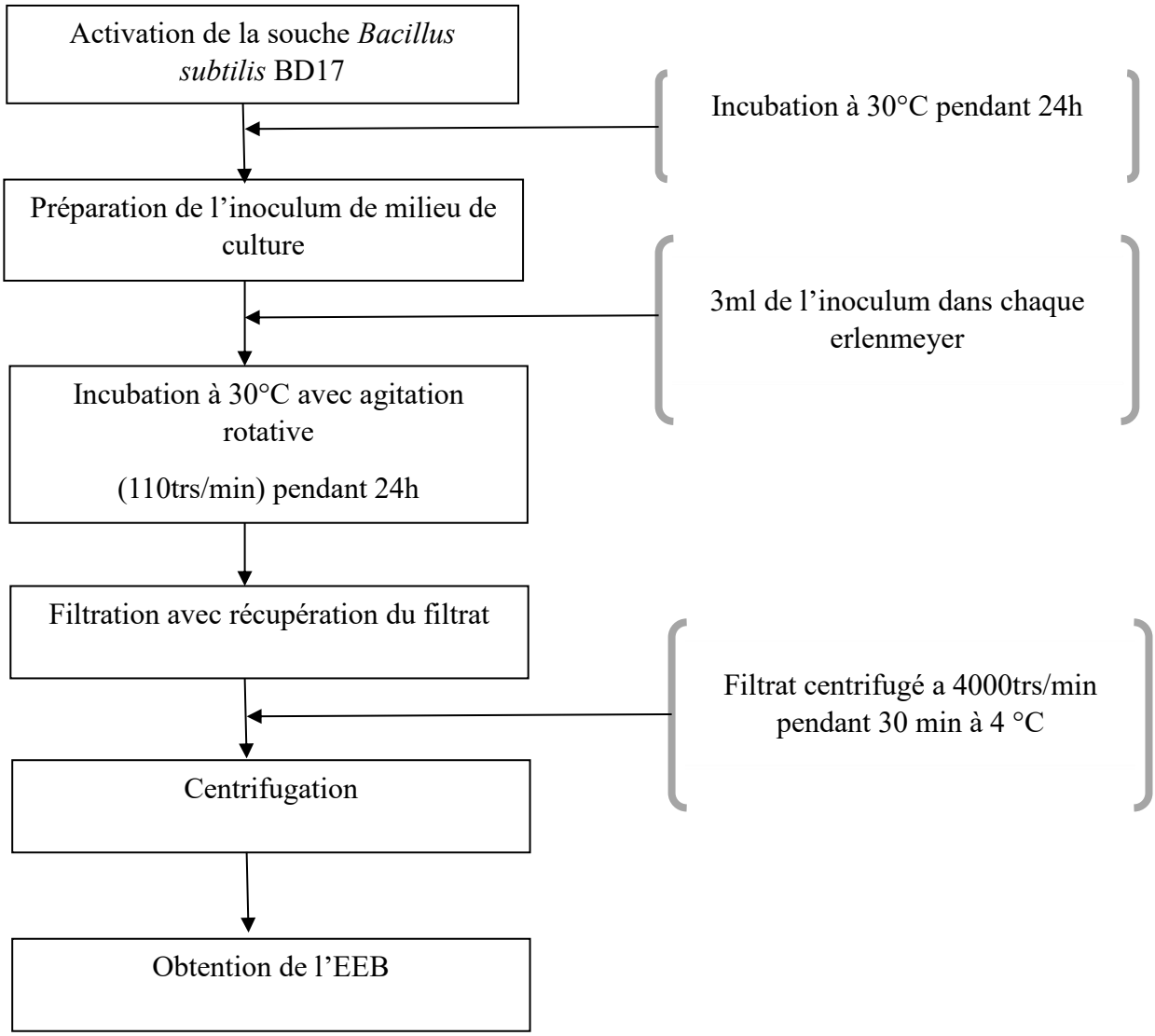


Figure 11: Protocole d'obtention de l'extrait enzymatique brut produit par la souche Bacillus subtilis BD17

II. Matériel végétal

1. Matière première employée

Les capitules frais d'artichaut ***Cynara scolymus*** ont été utilisés pour extraire la cynarase (Figure n°12). On a collecté les capitules de ***Cynara scolymus*** vers la fin du mois de février. L'artichaut est un légume couramment cultivé pendant l'hiver, et il est largement consommé, en particulier dans le nord de l'Algérie.

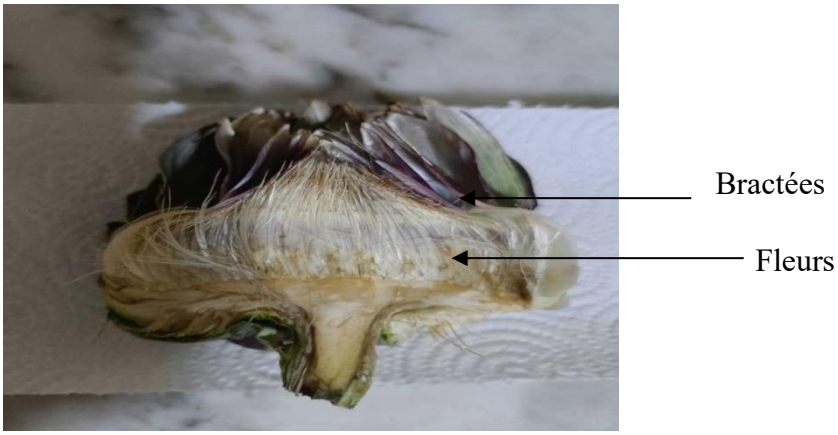


Figure 12: : Coupe schématique d'un capitule d'artichaut (Cynara scolymus)

2. Obtention et prétraitement des fleurs d'artichaut

Les capitules de *Cynara scolymus* (fleurs d'artichaut) récoltées en mois de février au niveau de la région de Médéa (Médéa, Algérie). Elles sont séchées à l'air libre Pendant 3 semaines, sur une toile qui ne retient pas l'humidité, conformément à la méthode décrite par plusieurs auteurs, dont l'un d'entre eux. **(Tsouli, 1974),** ensuite congelés à -18°C. Ce procédé permet aux échantillons de maintenir leurs activités pendant un certain temps. Les fleurs présentes dans le capitule peuvent être récupérées en grande quantité dans les centres de restauration collective ou mieux dans les conserveries d'artichaut, ce qui en fait des déchets d'épluchage du légume.

2.1. Extraction de l'enzyme brut végétal

Pour obtenir le système enzymatique des fleurs sèches d'artichaut, diverses méthodes d'extraction ont été utilisées et de nombreux protocoles ont été expliqués. Le protocole, appliqué dans notre travail est celui décrit par **Tsouli, (1974)** et **Laurent, (1974)**. L'extrait brut a été préparé par broyage, à l'aide d'un mortier, d'un échantillon de fleurs (10g) pris au hasard.

Ensuite la macération a été faite dans 50 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M (pH 5,4), additionné de 0,2% d'acide borique (**Annexe 3)** afin d'éviter ultérieurement toute prolifération de microorganismes. Après macération, une centrifugation à 5000 trs/min pendant 15 min a été réalisée, le surnageant qui en résulte a été filtré (papier Wattman n°1) et l'extrait brut de fleurs d'artichaut ainsi obtenu est utilisé tel quel (Extrait enzymatique brut ou EEB). Ou bien purifié pour des considérations analytiques. Le procédé est décrit dans le diagramme de la **Figure n°13.**

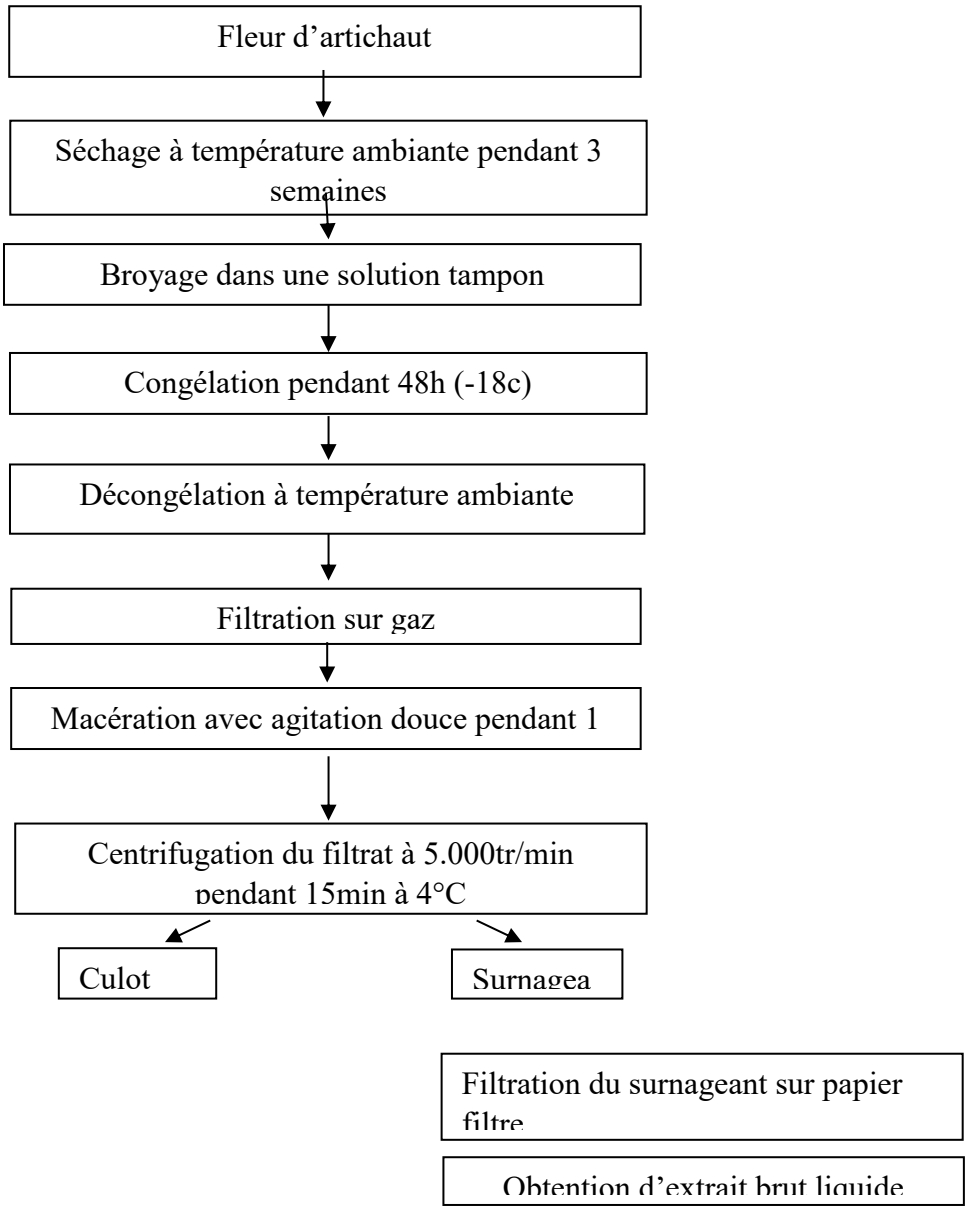


Figure 13: Etapes d'obtention de l'extrait enzymatique brut de Cynara scolymus.

3. Mesure des activités enzymatiques (microbienne et végétal)

➢ Mesure de l'activité coagulante (AC)

La mesure de l'activité de coagulation du lait a été réalisée en suivant le protocole décrit par **Siboukeur, Mati et Hessas, (2005) ; Shieh, Phan Thi et Shih, (2009)** avec des légères modifications. La poudre de lait écrème a été reconstituée en dissolvant 12g dans 100 de 0,5g/L de solution de CaCl2 (pH 6,5) (substrat de Berridge) **(Berridge, 1952) (Annexe 4).** On a réalisé le test de coagulation en combinant 10ml de substrat avec 1ml d'extrait enzymatique. Sa fondation repose sur l'observation visuelle de l'émergence des premiers flocons. L'activité de coagulation est exprimée en unités Soxhlet (US).1US est défini comme la quantité d'enzyme de coagulation dans 1 ml d'une solution contenant 0,12 g de lait écrémé en poudre et 0,11 g de $CaCl_2$ à 35 °C pendant 40 min. L'activité coagulante a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\mathbf{F\ (US) = 2400 \times V/T \times v}$$

F : force coagulante ;
V : volume du lait à coaguler (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 minutes) en secondes.
UP : unité présure

$$\mathbf{UP = 10 \times V/T \times Q}$$

V : volume de substrat ;
T : temps de coagulation ;
Q : volume d'extrait enzymatique ;

$$\mathbf{F\ (US) = UP/0.0045}$$

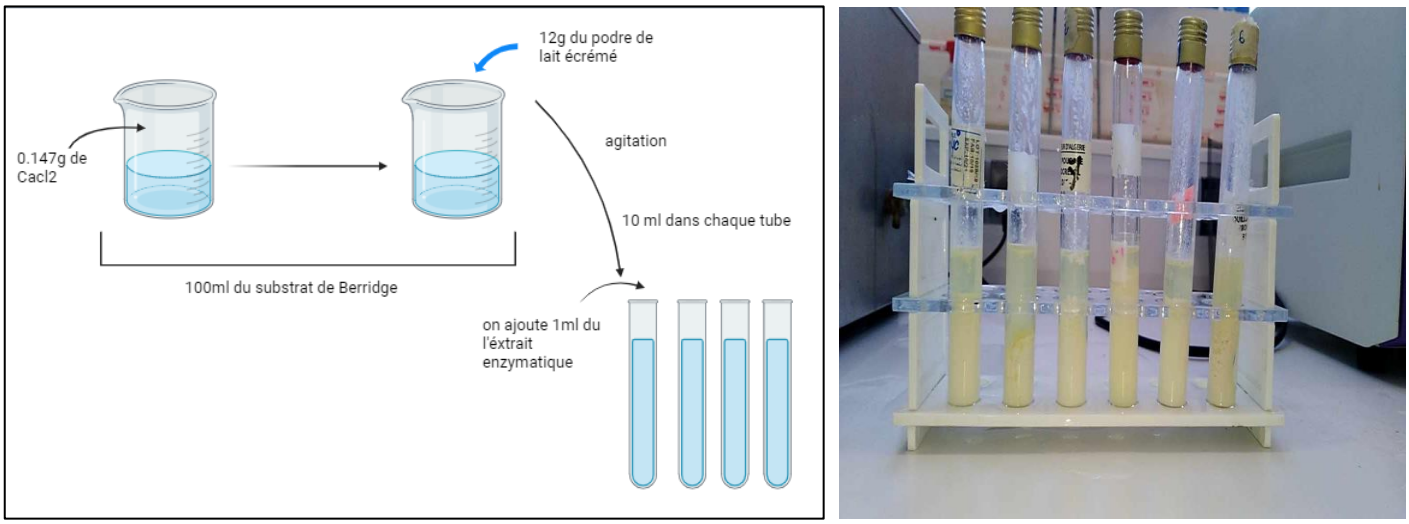


Figure 14: schéma de la préparation de substrat de Berridge pour mesurer l'activité coagulante de l'extrait enzymatique.

N.B : le tableau qui représente le test de coagulation du lait en utilisant le substrat de Berridge pour calculer l'activité coagulante est donné en (**Annexe5).**

- **Mesure de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique a été évaluée en utilisant la méthode mentionnée par **Siboukeur, Mati et Hessas, (2005)** ; **Shieh, Phan Thi et Shih, (2009) ; Silva *et al.*, (2014)** Le mélange réactionnel est constitué de 0,4 ml de tampon acétate 0,2mol/L à pH 5,5 et de 0,2 ml d'enzyme brute. La réaction a été réalisée dans un bain à 35°C et a été arrêtée après 30 minutes en ajoutant 1 ml d'acide -trichloracétique 10% (TCA). 2 ml de filtrat ont été ajoutés à 5 ml de solution de NaOH (0,28 N) et 1,5 ml de réactif phénolique (solution de Folin-Ciocalteau phénol : eau = 1 : 2). Une fois que le mélange a été conservé à 35°C pendant 15 minutes, la densité optique (DO) a été mesurée à 660nm. On a mesuré l'activité protéolytique en utilisant des unités correspondant à la DO de 660nm.

- **Détermination de l'indice AC/AP**

Selon **Abdel-Fattah, El-Hawwary et Amr, (1974)** le rapport entre l'activité coagulante et l'activité protéolytique (AC/AP) dans les préparations enzymatiques est un indicateur de la qualité des présures de substitution par rapport à celles initiales **(Brutti *et al.* 2012)**. Grâce à cette mesure, on peut évaluer si une préparation enzymatique est capable de coaguler le lait de la même manière que la présure.

- **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) (Annexe 6).**

4. 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 (35C, 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.

5. Caractéristiques de l'extrait enzymatique

La caractérisation de l'extrait enzymatique passe par la détermination des conditions optimales de l'activité coagulante, cette dernière est susceptible d'être modifiée par plusieurs facteurs en particulier le pH, la concentration en $CaCl_2$ et la température.

- **Influence de la température**

La détermination de la température optimale d'action de l'enzyme se fait par observation du temps le plus court de coagulation du lait en variant les températures de 30°Cà 75°C par palier de 5°C.

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

La détermination de la concentration maximale en $CaCl_2$ de l'action de l'enzyme, se fait par observation du temps de coagulation du lait le plus court en variant les concentrations en $CaCl_2$ de 0,01M à 0,1M par palier de 0,01M.

- **Influence de la concentration en enzyme**

La détermination de la concentration optimale en enzyme se fait par observation du temps de coagulation du lait le plus court en variant les concentrations en enzyme de 0,3 à1,53mg/ml par palier de 0,2 mg/ml.

- **Influence du pH**

La détermination du pH optimum d'activité de l'extrait enzymatique se fait en
Mesurant le temps de coagulation en faisant varier le pH du lait de 5,2 à 7,2 par palier de 0,2.

II. Essai de fabrication du fromage à pâte pressée non cuite par l'utilisation de l'EEB (microbien et végétal)

1. Etapes de fabrication du fromage

L'essai de fabrication de fromage a pour objectif principal l'étude des aptitudes à la coagulation du lait de l'enzyme extraite en comparaison avec la présure commerciale. Cet essai a été effectué au sein du laboratoire de microbiologie de l'entreprise Arib de Ain Defla.

Nous avons élaboré trois types de fromage à pâte pressée dans les mêmes conditions se différenciant par :

- **Type 1 :** coagulation par EEB végétal ; F_v
- **Type 2 :** coagulation par EEB microbien ; F_m
- **Type 3 :** coagulation par présure commercial ; (la présure provient de FOOD MANIA)

Nous avons utilisé un volume total de lait de vache de 6 litres issu d'une ferme de la région de Beni Attali de la willaya de Médéa. Celui-ci est subdivisé en trois bacs de 2 litres de contenance. Le procédé de fabrication utilisé a été proposé par Fondation Itqan pour les métiers d'avenir wilaya de Sétif.

- **Préparation du lait**

Avant la pasteurisation du lait, on a vérifié certains paramètres comme le pH, l'acidité, la densité, l'EST, l'ESD et le pourcentage de matières grasses pour connaître les paramètres du lait à utiliser dans la fabrication du fromage. (**Annexe9)**

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 gde $CaCl_2$afin d'ensemencer le milieu avec les ferments lactique (mésophiles) qui intervient dans l'affinage des fromages à pâte pressée et d'amener le lait à son pH d'emprésurage.

1.1. Pasteurisation

C'est un traitement thermique du lait il permet l'élimination des germes pathogènes du lait se fait à une température de 80°C jusqu'à 100°C pendant 20 secondes pour ne pas altérer les propriétés organoleptiques du lait **(Majdu, 2009).** Après refroidissement du lait à 42°C, on ajoute 2.5 g de $CaCl_2$.



Figure 16: pasteurisations du lait



Figure 15: refroidissement du lait

2.2. Ensemencement du lait traité

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

Pour réduire le pH du milieu, il est nécessaire de convertir le lactose en acide lactique. Effectuer une contribution aux caractéristiques organoleptiques des fromages en libérant les enzymes.

2.3. Emprésurage

Cette étape est réalisée quand le pH est d'environ de 6.4 et à la température de 37°C pour la présure et les EEB microbien et végétal. 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 :

- F EEB_v= 1/1288 ⟹ la dose=1.5 ml/2l ⟹ temps de coagulation totale 45min
- F EEB_m= 1/2294 ⟹ la dose=0.87 ml/2l ⟹ temps de coagulation totale 38min
- F Présure commerciale=1/5000 ⇨ la dose =1ml/2l ⟹ temps de coagulation totale 30min

2.4. Egouttage et pressage

Presser le caillé avec un tissu et l'égoutter sans perdre le caillé. Enfin, ce dernier a été pressés avec des plaques solides pendant 5h à 7h pour augmenter l'extrait sec, faciliter l'égouttage du lactosérum restant, et donner au fromage une bonne texture.



Figure 17: Egouttage (séparation entre le caillé et le lactosérum) (photo originale 2024)

2.4. Le salage

Une fois pressées, les morceaux de fromage sont immergés 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.
- Il révèle la saveur propre du fromage en influençant le goût et en renforçant les arômes. **(Mahaut, 2008).**



Figure 18: salage du fromage (photo originale 2024)

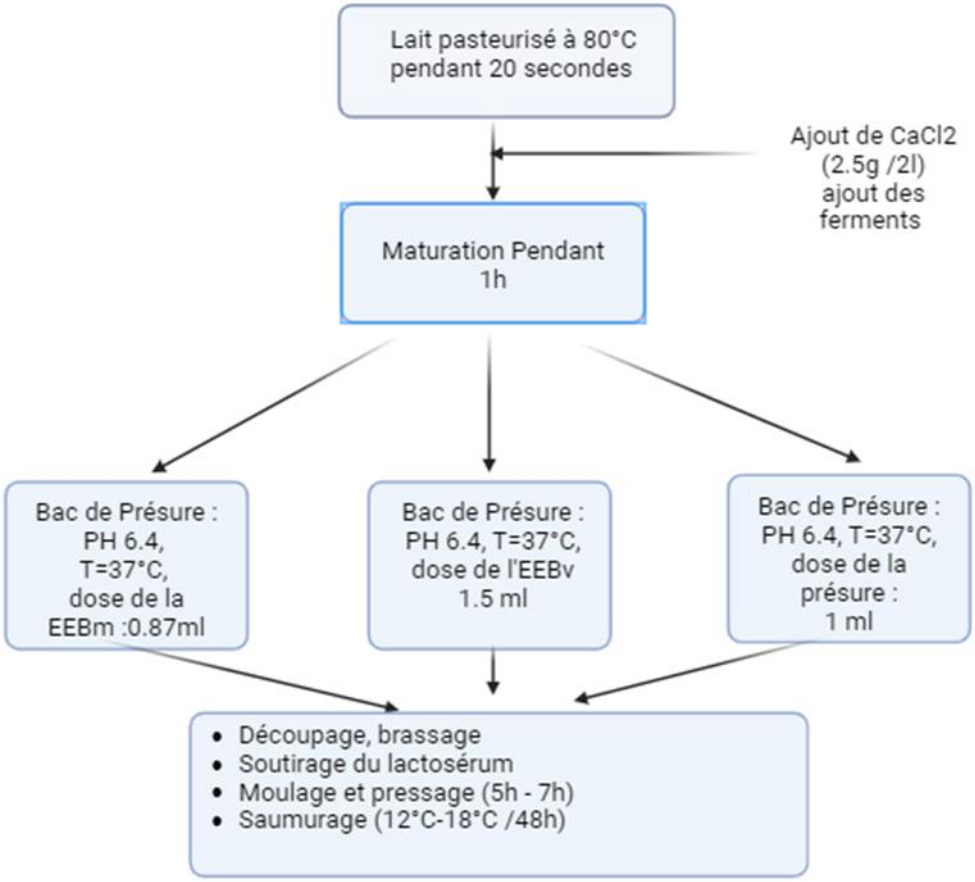


Figure 19: Étapes générales de la fabrication de fromage à pâte pressée non cuite

3. Analyses physico-chimiques du fromage

❖ Mesure de pH

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

❖ Détermination de l'acidité

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

❖ Extrait sec total du fromage

Un échantillon de 1 g de fromage est soumis à une dessiccation à 105°C à l'aide d'un dessiccateur muni d'une balance. L'extrait sec total est exprimé en pourcentage de la masse du résidu.



Figure 20: mesure de l'extrait sec total à l'aide d'un dessiccateur

❖ Matière grasse

La teneur en matière grasse du fromage est déterminée par l'utilisation de la méthode acido-butyrométrie de Van Gulik **(AFNOR, 1982) (Annexe 7).**

❖ Extrait sec dégraissé (ESD)

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

ESD (%) = (EST – MG) x 100

❖ 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) **(Vandeweghe, 1987).** Il est déterminé par la formule suivante :

Rdt = 10 x ESD x Pds/V

Rdt : Rendement fromager ;

ESD : Extrait sec dégraissé ;

Pds : Poids ;

V : Volume du lait mis en œuvre ;

4. Analyse microbiologique du fromage

4.1. Objectif

L'objectif principal des analyses microbiologiques est d'assurer la sécurité sanitaire des aliments en détectant et en dénombrant les micro-organismes pathogènes et d'altération. Ces analyses permettent de contrôler les microorganismes indésirables dans les aliments, de valider les procédés de fabrication, d'optimiser la durée de vie des produits, d'identifier les sources de contamination, et de prévenir les risques pour la santé des consommateurs.

Le prélèvement du fromage se fait à l'aide d'une spatule, nettoyé à l'alcool dans les meilleures conditions assurées par la flamme.

Les germes recherchés dans le fromage sont indiqués dans **l'annexe 11**

5. Analyses sensorielles du fromage

L'analyse sensorielle a pour but d'estimer les qualités organoleptiques du fromage, elle est basée sur les appréciations de jury de dégustation. Les échantillons de fromage étaient présentés en même temps (codés par des lettres).

Le test de dégustation est mené sur trois (03) échantillons du fromage fabriqué (type pâte pressée non cuite) :

- Le premier fabriqué avec l'extrait enzymatique brut *de Cynara scolymus*
- Le deuxième fabriqué à partir de l'extrait enzymatique brut de *Bacillus subtilis*.
- Le troisième fabriqué à partir de présure commerciale.

Le dégustateur doit se rincer la bouche en passant d'un fromage à un autre pour éliminer le goût du fromage précédent.

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée selon la méthode de **Kramer (1960).** Cette méthode est appréciée par le calcul de la moyenne des scores (notes attribuées par les **16** panélistes pour chaque échantillon de fromage) et la somme des rangs (classement selon le score des différents fromages). La différence entre les différents fromages est jugée non significative dans l'intervalle de rang total compris entre [25-35] au seuil de probabilité de 5%.

Chapitre III
Résultats et discussions

1. Identification de la souche

2. Etude macro et microscopique

Tableau 5: l'observation macro et microscopique

La souche	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Gram	Largeur en mm
Bacillus	Colonies sèches mâtes plats bordures dentelées	Petite Bacilles pas de spore en apparence	+	6mm

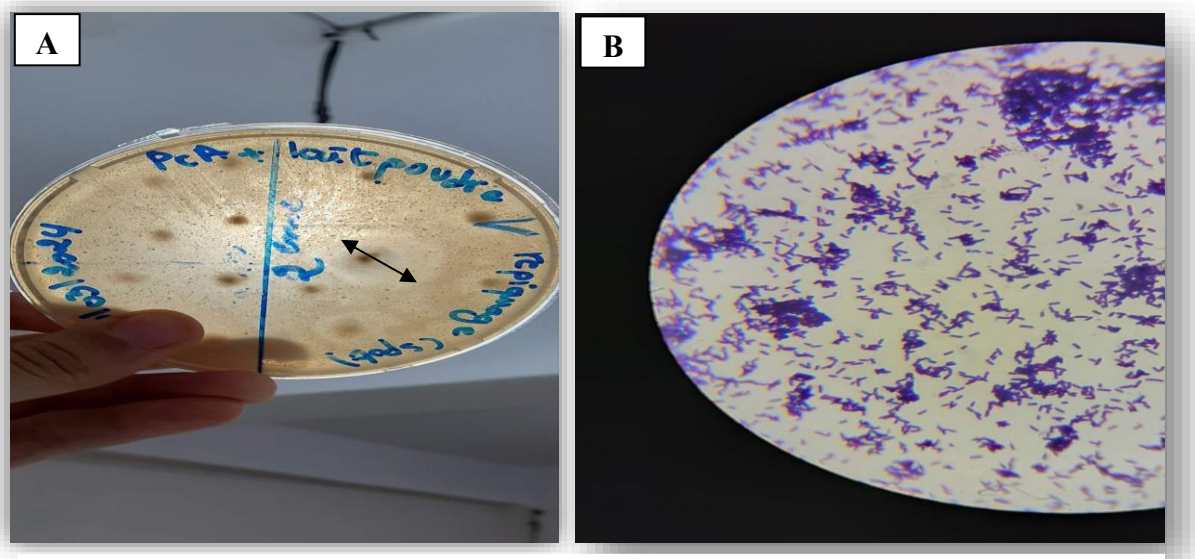


Figure 21: (A) dégradation de caséine ; (B) : observation microscopique de la souche de *Bacillus subtilis BD17* (photo originale ; 2024)

La **figure 21B** montre que la souche isolée est une Bacille à Gram positif.

La souche a formé un halo transparent sur milieu le PCA additionné de 12% de lait **(Figure21A)** cela signifie que la bactérie fait l'hydrolyse de la caséine donc elle possède une activité protéolytique.

3. Teste catalase

Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.



Figure 22: teste de catalase + (photo originale ;2024)

4. Identification moléculaire de la souche *Bacillus subtilis* BD17

L'identification de la souche par le produit de PCR séquencé par Gene Life Sciences. En plus de l'identification biochimique et morphologique, le gène rARN 16S a été amplifié avec succès à partir de l'ADN génomique de la souche BD17.

I. Résultats de l'extraction de l'extrait enzymatique d'origine microbienne

1. Production d'enzyme coagulant le lait

a. Conditions de fermentation

D'après l'étude préalable entreprise sur les conditions de fermentation de la souche *Bacillus* il s'est avéré que les conditions optimales sont : 5g de son du blé et un temps d'incubation de 72 h.

Donc nous avons opté pour ces conditions de fermentation pour la production de l'extrait enzymatique brut

Tableau 6: Conditions optimales de fermentation de la souche Bacillus subtilis BD17.

Essai	2.5g/24h	2.5g/48h	2.5g/72h	5g/24h	5g/48h	5g/72h
Temps de coagulation	Absence de coagulation	8 secondes	5 secondes	4 secondes	2 secondes	1 seconde

- D'après le résultat obtenu, une incubation de 24h n'a donné aucune coagulation.
- L'essai n°06 (5g de son du blé /72h) a donné le temps de coagulation le plus meilleur. De ce fait, on a opté pour cet essai pour la suite de notre expérimentation.

2. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

2.1. L'Activité coagulante de l'EEB

La force coagulante de l'extrait brut est de l'ordre de ce qui indique que 1Ld'extrait enzymatique coagule de substrat de Berridge. Comparée aux activités de présure bovine de référence et aux données bibliographiques relatives au genre *Bacillus*, la force coagulante obtenue est relativement forte (**Tableau 7),** cette différence pourrait s'expliquer par les conditions de fermentation.

Tableau 7: Comparaison de l'AC de l'EEB aux autre AC des coagulases du genre Bacillus et de la présure bovine.

Effectivement, **Ding *et al.* (2011)** ont constaté que l'activité coagulante d'un extrait enzymatique est soumise à l'influence de divers facteurs environnementaux, notamment la concentration en glucose, la taille de l'inoculum, la durée d'incubation et le volume du milieu. Cette constatation souligne la nécessité d'optimiser le milieu de culture.

Cette valeur est bien comparée aux activités coagulantes des autres souches. En effet, on remarque que l'activité coagulante de notre souche est plus faible par rapport à celles trouvées pour les souches *Bacillus licheniformis* BL312**,** *Bacillus mojavensis* P47M et *Bacillus amyloliquefaciens* D4. En revanche, cette activité est beaucoup plus importante que celle obtenue par **(Shieh, Phan Thi et Shih, 2009) ;(Lemes *et al.*, 2016) ; (Kumari Narwal *et al.*, 2016)** et **(Boumediene *et al.*, 2021)** pour la souche *Bacillus* sp. P45, *Bacillus subtilis* natto, *Bacillus subtilis* MTCC 10422 et *Bacillus velezensis*FK6A respectivement **(Tableau7).**

2.2. Activité protéolytique, indice AC/AP et teneur en protéine de l'EEB

- **Activité protéolytique et indice AC/AP microbienne**

Au cours de la coagulation du lait, il est important de connaitre le degré de protéolyse des extraits enzymatiques coagulantes qu'elles soient animales, microbiennes ou végétales. Une activité protéolytique trop élevée est à l'origine du développement d'amertume retrouvée dans les produits fromagers.

Les résultats de l'activité protéolytique et le rapport AC/AP de l'EEB_m sont indiqués par le **Tableau 08**

Tableau 8: Activité protéolytique et rapport AC/AP de l'EEB.

Les résultats du tableau 8 montrent que l'activité protéolytique obtenue par l'EEBm est faible par rapport à l'EEB obtenue par **Boumediene *et al.*, (2021) (0.362).** Par ailleurs, cette activité est presque proche de celle obtenue par *Bacillus mojavensis* P47M **(Kahlouche et Nouani, 2017)** et celle obtenue par *Mucor mucedo* DSM **809(Yegin, Goksungur et Fernandez-Lahore, 2012).**

Le rapport de l'activité coagulante à l'activité protéolytique d'une enzyme est crucial pour déterminer sa pertinence en tant que substitut de la présure **(Abdel-Fattah et El-Hawwary, 1974 ; Yegin, Goksungur et Fernandez-Lahore, 2012).** Comparativement à la présure, l'EEB présente un indice AC/AP plus élevé par rapport à celui obtenu par **Boumediene *et al.*, (2021)**, ceci indique que l'activité protéolytique de l'EEB est faible. Par ailleurs, dans une étude similaire portant sur la protéase dérivée de *Bacillus subtilis*, **(Pant *et al.*, 2015)** ont noté une activité protéolytique significative. Ces auteurs ont suggéré la possibilité de combiner cette enzyme bactérienne avec la présure commerciale dans un rapport de 1 pour 1, afin d'améliorer le rendement fromager.

- **Teneur en protéine de l'EEBm**

La teneur en protéines de l'EEB déterminée par la méthode colorimétrique de ***Lowry et al,* (1951) (Annexe 5)** est de l'ordre de 9.54 mg/ml. Dans des études similaires sur *Bacillus mojavensis* P47M **Kahlouche and Nouani, (2017)** indiquent des concentrations en protéines presque similaire par rapport à celle obtenue par l'EEB de notre souche. Et le résultat obtenu par l'EEBm est faible par rapport à l'EEB obtenue par **Kumari Narwal et al., (2016).**

II. Résultats de l'extraction de l'extrait enzymatique d'origine végétale (EEBv)

1. Matière première et extraction

Il est crucial de prendre en compte la nature de la matière première à l'origine des protéases coagulant le lait ou d'autres métabolites présentant un intérêt technologique lors de la

transition vers une production industrielle en vue du développement durable. Cette considération permet d'évaluer les contraintes environnementales associées à ce processus.

L'extraction de l'enzyme cynarase est effectuée à partir des fleurs, également connues sous le nom de capitule. L'optimisation du rapport masse entre le foin et la solution d'extraction (Solution Acétate Tampon) est essentielle pour deux raisons principales : maximiser l'extraction de l'enzyme tout en facilitant la macération du mélange. En effet, les fleurs séchées ont une capacité d'absorption importante, ce qui peut rendre la macération du mélange difficile pour l'opérateur. Ce phénomène est probablement dû à la composition chimique des fleurs, qui contiennent environ 36% de sucres et 37% de fibres **(Site web : www.anses.fr).** Ces composants ont une forte capacité de rétention d'eau. Dans nos conditions expérimentales, le mélange destiné à l'extraction de l'enzyme brute consiste en 10 gramme de fleurs séchées pour 50 millilitres de solution tampon.

L'utilisation des capitules dans la coagulation des laits présente l'avantage d'une extraction simple des enzymes en utilisant des solutions aqueuses non toxiques, ce qui est une alternative économique par rapport aux systèmes enzymatiques d'origine animale coûteux **(Moschopoulou, 2006)** ou microbienne **(Kahlouche et Nouani, 2017).** Cependant, sa principale contrainte réside dans sa rareté, surtout pendant la saison hivernale en Algérie. Malgré une production et une consommation domestique significatives, la collecte reste ardue et l'approvisionnement en matière première dépend largement du développement de l'industrie de la conserve dans notre pays **(Nouani *et al.*, 2009)**

L'extrait coagulant brut des fleurs d'artichaut présente une légère odeur prononcée et une couleur brun foncé. En effet, la teinte brune de cet extrait enzymatique brut est attribuable à la présence abondante de composés phénoliques dans l'artichaut Cette richesse en composés phénoliques favorise le processus de brunissement enzymatique. **(Nouani *et al.*, 2009)**

Tableau 9: Caractères apparents de l'extrait enzymatique brut.

	Caractère apparent	
	Odeur	**Couleur**
Extrait enzymatique brut de L'artichaut (EEB_v)	Du végétal Prononcée	Brune foncée



Figure 23: Caractère apparent de l'extrait enzymatique brut.

2. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

2.1. L'Activité coagulante de l'EEBv

Après l'extraction, l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut issue des fleurs d'artichaut a été déterminée par les méthodes de Soxhlet.

La force coagulante de l'extrait brut est de l'ordre de ce qui indique que 1L d'extrait enzymatique coagule de substrat de Berridge.

Cette valeur est faible par rapport à celle de la présure commerciale, dont la force est d'environ 1/10000. Paradoxalement, elle est plus élevée à celle observée par **Boumediene, (2021)** pour l'extrait de la même plante (127US) ; ainsi que la valeur obtenue pour EEBv du notre expérience est plus importante par rapport à celle observé par **Kahlouche et Nouani, (2017)** pour l'extrait coagulant de Tournesol (28.57 US).

Tableau 10: Activité coagulante de l'extrait enzymatique brut des fleurs d'artichaut

Pour augmenter l'activité enzymatique, **Tsouli (1979)**, l'un des chercheurs dans le domaine des coagulases, a expérimenté diverses méthodes alternatives. Il a notamment utilisé de l'alcool éthylique. Ses expériences ont impliqué plusieurs techniques d'extraction, en modulant la température de broyage des fleurs, ainsi que l'utilisation de différentes variétés de plantes à différents stades de développement. Les conclusions de ses recherches soulignent

l'importance du stade de développement et de la variété végétale ; l'activité enzymatique est plus élevée chez les variétés sauvages que chez les variétés cultivées.

En comparaison avec les résultats obtenus dans les études sur les présures végétales, la valeur observée dans nos échantillons est plus importante celle rapportée pour l'extrait de fleurs de *Calotropis gigantea* (couronne de fleurs) **(Anusha *et al.*, 2014).** Ainsi, **Park *et al.* (2000)** ont démontré que la protéase aspartique purifiée à partir de *Helianthus annuus*, variété IS-3311, présente une activité coagulante quasiment insignifiante (20 ~ 10^{-3} U mg^{-1}, déterminée à 35°C et pH 6,0). Une tendance similaire a été signalée par **Egito *et al.* (2007)** (5,8.10-3 et 39. 10-3 U mg^{-1}), respectivement pour les graines d'Albizia lebbeck (bois noir des Bas) et *Heliantus annus* (tournesol).

Il est évident que les protéases coagulant le lait, obtenues selon différents protocoles d'extraction, peuvent produire des résultats contradictoires. Les variations dans l'activité coagulante peuvent être attribuées, d'une part, aux différences dans les procédés utilisés, où la composition chimique de chaque tampon peut influencer certains aspects du système enzymatique des fleurs d'artichaut. En outre, de manière générale, une teneur élevée en matière sèche totale des extraits coagulants végétaux est souvent associée à une activité enzymatique plus importante.

Cependant, exprimée en unité présure, notre extrait enzymatique présente une activité coagulante d'environ, ce qui est relativement faible par rapport à celle rapportée par **Mekhaneg *et al.* (2018)**, qui est d'environ 11,1 ± 0,2 UP pour présure animal.

Tableau 11: Comparaison de l'AC de l'EEBv aux autre AC des coagulases d'origine végétale

2.2. Activité protéolytique de l'EEBv

Lorsqu'on évalue l'activité protéolytique en mesurant l'absorbance des hydrolysats de caséines à 660 nm induits par les extraits bruts Par exemple, avec un volume d'extrait enzymatique de 0,2 ml, l'absorbance après incubation et catalyse est de 1,078, Cela suggère que l'action de rupture de la liaison Phe105-Met106 de la caséine κ par les aspartyl protéases, comme celles présentes dans l'extrait d'artichaut, est similaire à celle de la chymosine et d'autres protéases d'origine fongique et bactérienne **(Sidrach *et al.*, 2005).** De plus, l'effet protéolytique observé est comparable à celui des extraits de *Cynara cardunculus*, qui sont largement utilisés dans la fabrication des fromages **(Silva *et al.*, 2002).** Dans la littérature, il est noté que pour les enzymes coagulantes d'origine végétale (telles que celles de l'artichaut et du figuier), l'activité protéolytique est significativement plus élevée que celle de la présure commerciale.

2.3. Détermination du rapport AC/AP

La mesure de l'indice AC/AP permet de confirmer le pouvoir coagulant des succédanés de la présure. Dans nos conditions expérimentales, l'indice AC/AP de l'extrait enzymatique brut de protéase des fleurs d'artichaut a été évalué à 1194.8. En comparant cet indice à celui rapporté **par Brutti *et al.* (2012)** pour différentes plantes **(Tableau 12)**, il semble que la valeur obtenue soit significative et confirme les capacités de cette espèce à être utilisée dans l'industrie fromagère **(Silva *et al.*, 2002).**

Tableau 12: Valeurs du rapport AC/AP des enzymes coagulant le lait de quelques plantes (**Brutti *et al.*, 2012).**

Espèce végétale	AC (UP/ml)	AP (Ucas/ml)	AC/AP
Onopordum acanthium	0.546	0.019	9.58
Cynara cardunculus	103.6	16.4	5.34
Bromelia balansae	6.85	1.32	5.19
Bromelia hieronymi	10	2.39	4.18
Chymosin bovine	784	0.04	19607
Cynara scolymus (Notre échantillon)	*****	**1.078 (DO)***	*****

UP : Unité présure, **Ucas :** Unité caseinolytique.
*:Pour notre échantillon l'activité enzymatique et l'activité protéolytique sont exprimées en Unité Soxhlet (US) et DO respectivement.

3. Conditions optimales de l'activité coagulante des extraits enzymatiques

- **Influence de la température sur l'activité coagulante de l'EEB**

L'étude de la température optimale du lait sur l'activité coagulante des l'extraits enzymatiques bruts (EEB) microbienne et végétal a été réalisée sur une plage de températures allant de 30°C à 80°C par un palier de 5°C.

Nos résultats montrent une augmentation graduelle de l'activité coagulante avec l'élévation de la température, atteignant son maximum aux alentours de 80°C.Au-delà de 75°C on note une baisse rapide de l'activité coagulante, puis s'annule à 85°C (inhibition totale de

l'enzyme microbienne et de 65°C on note une baisse de l'activité coagulante, puis s'annule à 70°C (inhibition totale de l'enzyme végétal).

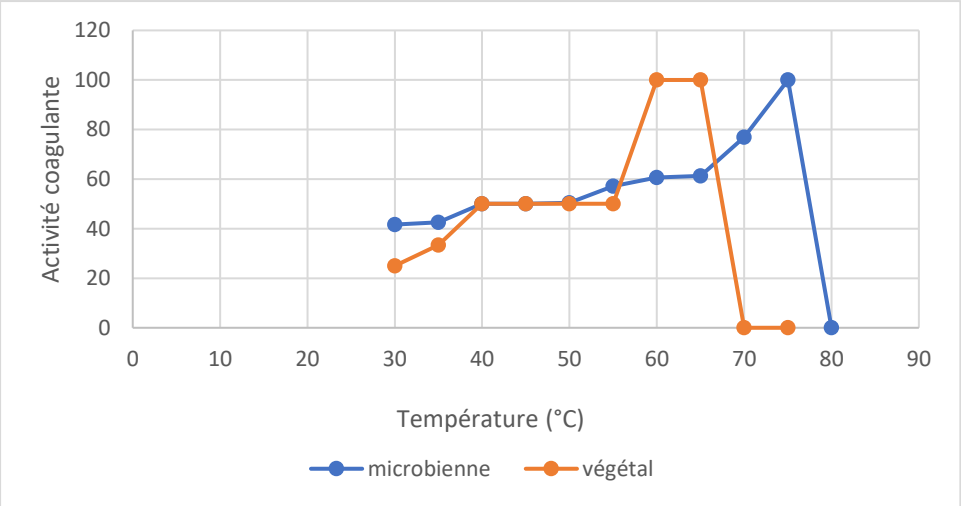


Figure 24: : Influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques obtenus

Nos résultats révèlent que la température optimale de notre extrait enzymatique brut microbien 75°C est similaire à celle rapportée par **Ahmed et Helmy (2012)** pour la souche *Bacillus licheniformis* 5A5. **Pant *et al.* (2015)** ont constaté une activité optimale chez *Bacillus subtilis* à 50°C, tandis que **Poza *et al.* (2003)** ont enregistré une température optimale de 37°C pour la protéase de *Myxococcus xanthus*. Ainsi, **Kumari Narwal *et al.* (2016)** ont constaté que la protéase de *Bacillus subtilis MTCC 10422* présente une température optimale de 45°C.En revanche, des températures optimales plus élevées ont été observées chez des protéases telles que *Rhizopus ryzae*, *Penicillium oxalicum* et *Cryptococcus albidus* **(Kumar *et al.*, 2005)**. Généralement, les extraits enzymatiques d'origine animale montrent une activité significative à des températures modérées, tandis que les coagulases d'origine microbienne et végétale sont plus actives à des températures élevées **(Talantikite, 2015)**.

En effet, une température optimale de l'ordre de 65°C a été enregistrée pour l'EEBv. De manière générale, les enzymes d'origine végétale se distinguent par leurs températures optimales d'activité et leurs températures létales, qui sont souvent bien supérieures à celles observées pour les enzymes d'origine animale et bactérienne, y compris la présure. Plusieurs études antérieures **(Alais et Lagrange, 1972 ; Lo Piero *et al.*, 2002 ; Nouani, 2009 ; Gagaoua *et al.*, 2017 ; Afsharnezhad *et al.*, 2018)** ont corroboré ces observations.

Bey *et al.* (2018) ont observé que l'activité coagulante de l'extrait de *Foeniculum vulgare* reste stable dans une plage de températures allant de 35 à 45°C, avec un pic d'activité à 60°C, suivie d'une diminution à 65°C.

À la lumière des résultats de notre étude, il semble que les coagulants d'origine végétale offrent l'avantage d'accélérer le processus de fabrication du fromage, notamment lorsque la coagulation du lait se produit à des températures plus élevées.

- **Influence de la concentration en CaCl2 du lait**

La concentration de calcium ionique dans le lait est liée aux propriétés de coagulation, où une concentration plus élevée de calcium conduit à des temps de coagulation plus courts **(Glantz *et al.*, 2011).**

La variation de la concentration en $CaCl_2$ du lait est obtenue par addition des doses croissantes d'une solution dans un intervalle de 0,01M à 0,1M par palier de 0,01M de $CaCl_2$ dans le but de situer l'optimum de l'activité coagulante des extraits enzymatiques bruts.

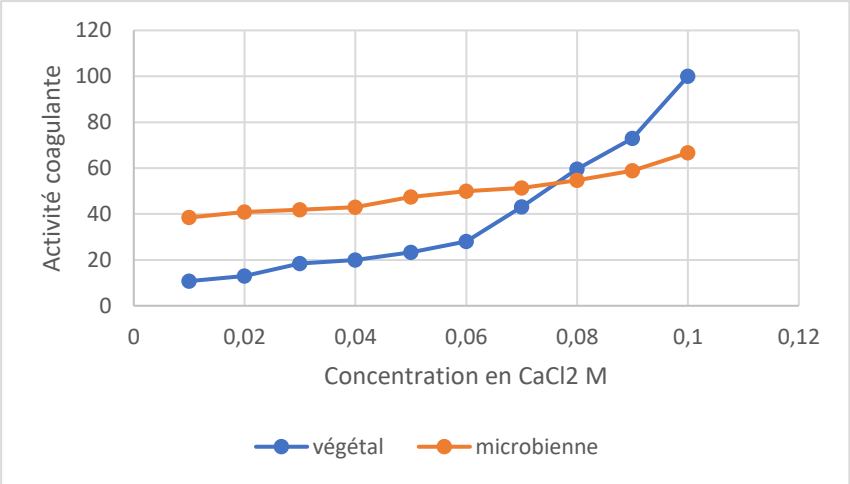


Figure 25: Influence de la concentration en $CaCl_2$ du lait sur l'activité coagulante relative de la Cynarase et l'extrait enzymatique microbien.

Pour examiner l'effet du calcium sur l'activité coagulante de la protéase de *Bacillus subtilus*, du chlorure de calcium CaCl2 a été ajouté au lait à des concentrations variant de 0,01M à 0,1M par palier de 0,01M. Les résultats présentés dans la figure 27 démontrent que l'activité coagulante de la protéase augmente avec la concentration en $CaCl_2$.

D'après **Ding *et al.* (2011)** et **Zhang *et al.* (2019)**, une concentration optimale de 50 mM a été observée pour les protéases de *Bacillus subtilis* B1 et *Bacillus licheniformis* BL312

respectivement. Notamment, les enzymes d'origine microbienne semblent être particulièrement sensibles à la diminution des concentrations en $CaCl_2$.

Au-delà de l'intervalle de 0 à 0,02 M, l'activité de la cynarase augmente et atteint un optimum à une concentration de 0,1 M.**(Alirezaei *et al.*, (2011)**ont déterminé que la concentration optimale en $CaCl_2$ pour l'extrait enzymatique d'*Actinidia chinensis* (variété de kiwi) est de 0,025 M. De même, **Ding *et al.*, (2011)** ont observé une activité coagulante maximale à 0,05 M pour la coagulase extraite de *Bacillus subtilis*. Il apparaît que les coagulases d'origine végétale sont très sensibles aux faibles concentrations de $CaCl_2$ dans le lait, montrant des activités inférieures par rapport aux coagulases d'origine animale et microbienne.

- **Influence de la concentration en extrait enzymatique brut**

L'activité des extraits coagulants a été évaluée en fonction de la concentration en extrait, en mesurant le temps de coagulation pour des concentrations variables en protéines de l'extrait, allant de 0,3 à 1,53mg/ml par palier de 0,2 mg/ml.

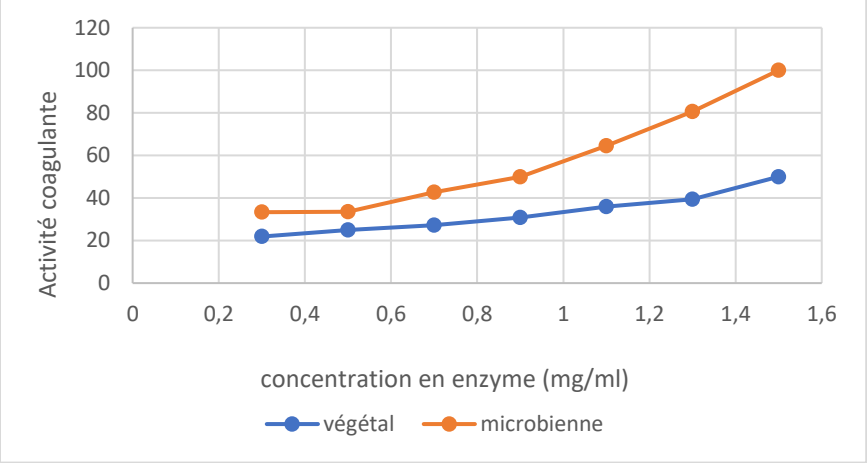


Figure 26: Influence de la concentration en extrait coagulant sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques bruts

Les résultats présentés dans la figure28 révèlent une augmentation graduelle de l'activité coagulante à mesure que les concentrations de l'extrait augmentent. Cependant, dans la plage de concentration testée, nous n'avons pas observé de seuil correspondant à une concentration saturante en enzyme. Selon **Van Hooydonk** et **Walstra (1987)** ainsi que **Payens *et al.* (1977)**, le temps de coagulation est généralement influencé par la concentration enzymatique.

➢ **Influence du pH sur l'activité coagulante de l'EEB**

L'activité coagulante est examinée dans le gradient de pH allant de 5,2 à 7,2 par palier de0,2.

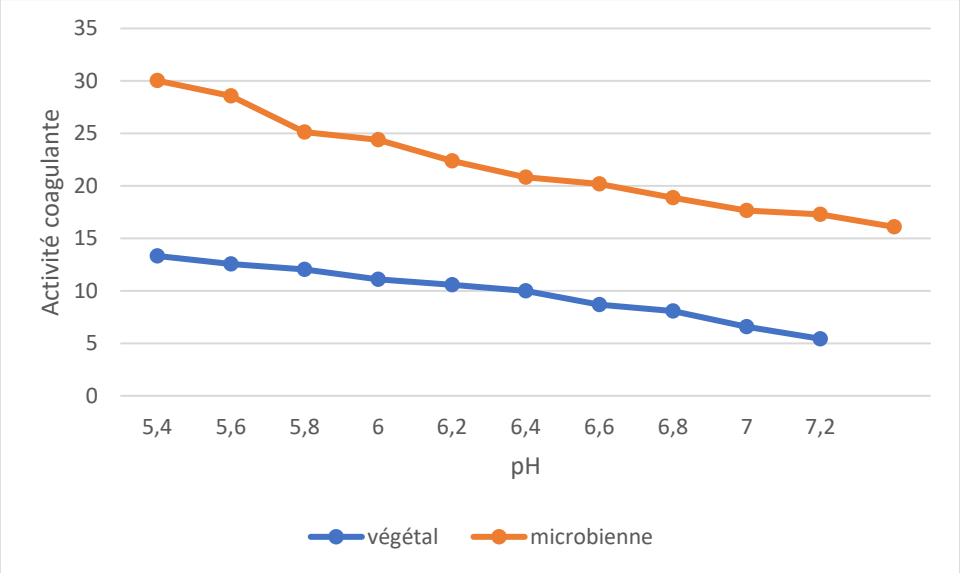


Figure 27: Influence du pH du lait sur l'activité coagulante relative de la Cynarase et extrait enzymatique microbien

L'observation de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique n'a pu se faire qu'à partir d'un pH de 5.2 car en dessous de ce pH, le lait coagule sans l'addition de l'extrait enzymatique (coagulation acide),

Les résultats enregistrés lors de notre expérimentation montrent que le temps de Coagulation le plus court est observé à pH 5,2 pour les deux coagulase. Cependant, l'activité maximale a été observée à pH 5,2 Au-delà de ce pH on observe une chute graduelle de l'activité coagulante. Le pH du lait a une grande influence sur les propriétés de gélification des coagulants **(Esteves *et al.*, 2003).**

Selon **Pant *et al.* (2015) et Bich Thuy et Bose, (2010)**, l'activité optimale de la protéase dérivée de Bacillus subtilis est observée à un pH de 7,4, **Bey *et al.* (2018)** ont démontré que le pH optimal pour l'extrait enzymatique de *Foeniculum vulgare* est de 6,4.

Etselon He *et al.* (2011), l'activité coagulante optimale de l'enzyme issue de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* D4 est à un pH de 5,5. Au-delà de cette valeur, l'enzyme subit une inactivation, notamment à un pH de 8.

Llorente *et al.*, (2014) ont rapporté que l'activité optimale de la coagulase extraite de l'artichaut se situe entre pH 4,5 et 5,5. En revanche, **(Rajagopalan et Sukumaran, (2018)** ont observé un pH optimal de 7,5 pour la coagulase extraite du laurier (*Wrightia tinctoria*). Après l'extraction et la purification d'une coagulase à partir d'*Aspergillus foetidus,* **(Souza *et al.*, (2017)**ont constaté une activité coagulante maximale à pH 5. En technologie fromagère, les valeurs habituelles de pH utilisées sont comprises entre 6,3 et 6,5. Dans certains cas, lorsque les conditions technologiques le permettent, comme pour les fromages frais ou les fromages fermentés à pâte molle, le pH du lait peut être abaissé à 6,2. **(Boumediene *et al.*, 2021).**

Le comportement de l'extrait de l'artichaut par rapport au paramètre pH est similaire à celui de la présure. En effet, selon les résultats de notre étude, ces deux coagulases présentent un optimum d'activité à pH 5,2, suivi d'une diminution de l'activité inversement proportionnelle aux valeurs de pH, jusqu'à être inactivées à pH neutre ou légèrement basique (figure 29). Des observations similaires ont été rapportées par **Nouani *et al.*, (2009)** concernant les extraits purifiés de Mucor pusillus.

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

1. Analyses physico-chimiques du lait cru utilisé

Pour évaluer la qualité des fromages produits avec l'EEB par rapport à ceux obtenus avec la présure commerciale, nous avons analysé leurs caractéristiques physicochimiques et organoleptiques.

Tableau 13: Composition physico-chimique du lait utilisé dans la fabrication fromagère.

Propriétés Physicochimiques	Acidité (°D)	pH	Densité à 20°C	MG (%)	EST g/l	ESD g/l
Échantillon	18	6.56	1.033	3.3	122.215	89.215
Normes AFNOR	14-18	6.4-6.8	1.028- 1.033	3.4- 4.4	-	-

Le lait analysé avant pasteurisation présente une composition de qualité et une fraîcheur apparente, conformes aux normes de fraîcheur définies par la norme **AFNOR (1986)** et reprises par le Journal Officiel de 1998**(Nel, 1998)**.

2. Analyses physico-chimiques du fromage élaboré type pâte pressée non cuit et le rendement fromager

a. Analyses physico-chimiques du fromage

Nous avons élaboré 3 types de fromages à pâte pressée non cuite référenciés comme suit :

F_v : fromage élaboré à partir de EEB_v

F_m : fromage élaboré à partir de EEB_m

F_p : fromage élaboré à partir de la présure commerciale

La composition physicochimique des trois fromages élaborés est indiquée dans le **tableau 14.**

Tableau 14: la composition physicochimique des trois fromages élaborés

Propriétés physicochimiques	pH	Acidité	MG g/l	EST g/l	MG/EST	ESD g/l	Rdt (%)
F_v	6.6	10	28	50.45	55.50	22.45	37
F_m	6.5	12	29	44.80	64.73	15.80	27.51
F_p	5.1	15	30	48.20	62.24	18.20	30.07

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois types de fromage. De plus, le pH est un facteur crucial pour contrôler la croissance bactérienne dans le fromage. Il est important de noter que le pH est lié à la qualité du fromage : un pH de 5,0 indique un fromage de bonne qualité, tandis qu'un pH supérieur à 5,2 correspond à un fromage qui se détériore plus rapidement **(Champagne *et al.*, 2003).**

Le ratio matière grasse/extrait sec total est une caractéristique significative des fromages. Il offre une évaluation précise de la quantité de matière grasse dans 100g d'extrait sec total (**Thieulin, 1976).** Nous observons que ce ratio est presque similaire pour les deux fromages produits avec l'EEBm et celle produits avec présure commercial, et forte par rapport au fromage obtenu avec EEB_v.

L'utilisation de l'extrait enzymatique microbienne et végétal conduit à un fromage présentant une acidité et une teneur en matière grasse comparativement plus faibles, similaires à celles observées dans le fromage fabriqué avec de la présure. Cette observation a été confirmée par plusieurs auteurs, qui ont souligné que l'acidité et le taux de matière grasse des fromages dépendent principalement de la nature et de la composition initiale du lait utilisé lors de la fabrication**(Roseiro *et al.*, 2003).**

Le taux d'extrait sec varie considérablement d'un type de fromage à un autre, et cela dépend largement de deux facteurs principaux : la composition initiale du lait et la méthode utilisée pour la coagulation et l'égouttage. Ces paramètres jouent un rôle déterminant dans la détermination du taux d'extrait sec du fromage **(Champagne *et al.*, 2003).**

b. Rendement fromager

Le rendement fromager revêt une grande importance dans l'industrie fromagère car il offre une vue d'ensemble de la répartition quantitative des composants du lait lors du processus d'égouttage. Ainsi, il permet d'évaluer si la fabrication d'un type spécifique de fromage a été réalisée dans des conditions optimales.

Les résultats concernant le rendement fromager de chaque fromage élaboré sont répertoriés dans le **Tableau 14.** Ce tableau indique qu'il n'existe pas de différence significative, en termes de rendement, entre les trois types de fromages.

D'après **Fenelon et Guinee, (1999)**, plusieurs facteurs jouent un rôle dans la détermination du rendement fromager. Parmi ces facteurs figurent le type de coagulant utilisé, la composition du lait, la quantité et les variations génétiques de la caséine, la qualité globale du lait, le comptage des cellules somatiques (CCS) dans le lait, le processus de pasteurisation du lait, la fermeté du caillé lors de la coupe, ainsi que divers paramètres impliqués dans le processus de fabrication.

IV. Les analyses microbiologiques

L'objectif de ces analyses est de prévenir les altérations microbiennes et de détecter la présence de germes pathogènes, ce qui pourrait compromettre la qualité hygiénique et commerciale du

produit. Cela revêt une importance capitale pour garantir la sécurité du consommateur en prévenant les intoxications alimentaires dangereuses. Les résultats des analyses bactériologiques du lait sont comparés aux normes établies par le Journal Officiel (JO) concernant les denrées alimentaires. Ces résultats fournissent le dénombrement des différentes flores présentes dans les échantillons de lait analysés, permettant ainsi une comparaison avec les critères microbiologiques établis par le JORA et lignes directrices et normes pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire.

Sur notre étude on observe une absence du :

- Les *Staphylococcus* aureus
- *Clostridium.*
- Les *Salmonelles.*
- Les Coliformes totaux

Tableau 15: résultats des analyses microbiologiques des trois fromages élaborés

Résultats **Germes recherchés**	**Résultats obtenue**			**Les normes JORA** **Germe /gramme**
	F_v	**F_m**	**F_p**	
Clostridium	Absence	Absence	Absence	Non détecté
Staphylococcus aureus	$1.2x10^4$	$2x10^4$	$1.1x10^4$	$5x10^5$
Salmonella	Absence	Absence	Absence	Non détecté
Coliformes totaux	$1.7x10^4$	$2x10^4$	$1.2x10^4$	10^7

IIIV. Propriétés sensorielles des fromages

1. Résultats du test de dégustation

Les caractéristiques organoleptiques ont été évaluées à l'aide du test Quick Rank de Kramer et **(Kramer, 1960).** Cette méthode est appréciée en calculant la moyenne des scores (notes attribuées par les 16 panélistes pour chaque lot) et la somme des rangs (classement selon le score des différents lots). La différence entre les différents lots (les trois fromages) est jugée non significative lorsque l'intervalle de rang total est compris entre 25 et 35, au seuil de probabilité de 5 %. Les résultats de l'analyse sensorielle portant sur les critères suivants : couleur, odeur,

texture, l'arôme et le gout des fromages à pâtes pressées non cuites préparés avec l'EEBm et l'EEBv et la présure commerciale, sont présentés sous forme de tableau récapitulatif **(Tableau 15)** et d'histogrammes **(Figures 30, 31, 32, 33, 34).**

Tableau 16: récapitulatif des résultats de test de dégustations obtenus sur les fromages élaborés

Fromage / **Caractère**	**F_V**		**Fm**		**F_P**	
	MS	SR	MS	SR	MS	SR
Couleur	3.93	29.5	3.87	32.5	3.75	34
Texture	3	29	2.68	33	2.43	34
Gout	2.87	30	2.93	29.5	2.62	36.5
Arome	3.06	3.93	3.13	3.87	2.66	3.75
Odeur	2.83	38	3.18	31	3.37	27

MS : moyenne des scores ; SR : sommes des rangs

- **Texture**

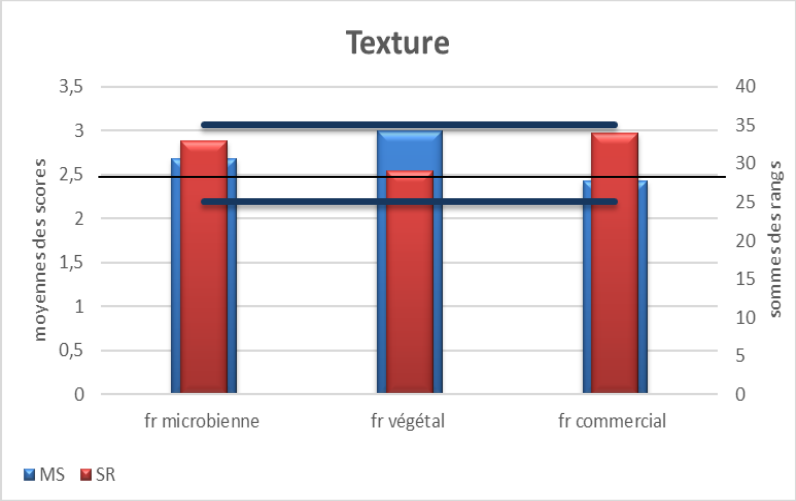


Figure 28: Histogramme des résultats des analyses du texture des fromages fabriqués

Limite d'acceptabilité de MS

L'intervalle de signification [25-35]

Selon **la somme des rangs (SR)**, les trois fromages se situent dans l'intervalle de signification [25,35]. Or, Les deux fromages microbien et commercial, présentent une somme des rangs (SR) supérieure à la limite acceptable, il est donc significativement mauvais.

Par ailleurs, **la moyenne des scores (MS)** attribués aux deux fromages (3, 2.68) respectivement pour le fromage microbien et le fromage végétal indique que la texture n'est pas appréciée par l'ensemble des panélistes.

- **Arome**

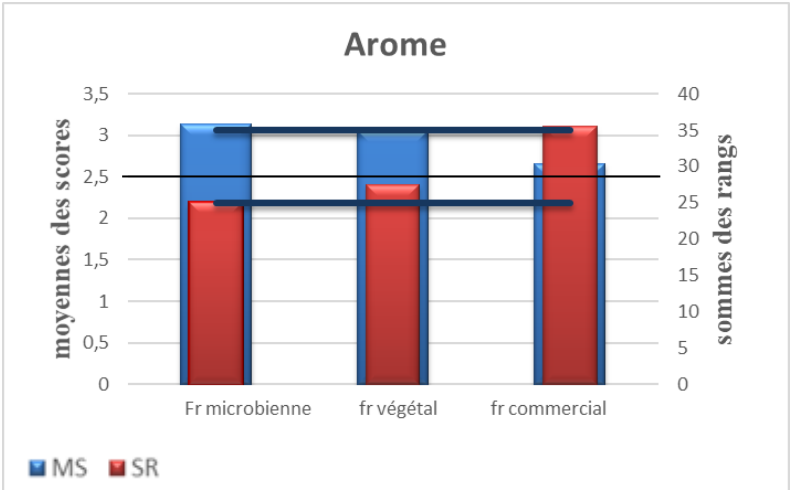


Figure 29: Histogramme des résultats des analyses d'arome des fromages fabriqués.

Selon **la somme des rangs (SR)**, les trois fromages se situent dans l'intervalle de signification [25,35]. Or, Les deux fromages microbien et végétal, sont statistiquement bon, leurs sommes des rangs (SR) sont inférieures à la limite acceptable.

Toutefois, **les moyennes des scores (MS)** relevés pour les deux fromages se rapprochent les unes des autres et sont supérieures à limite acceptable.

- **Odeur**

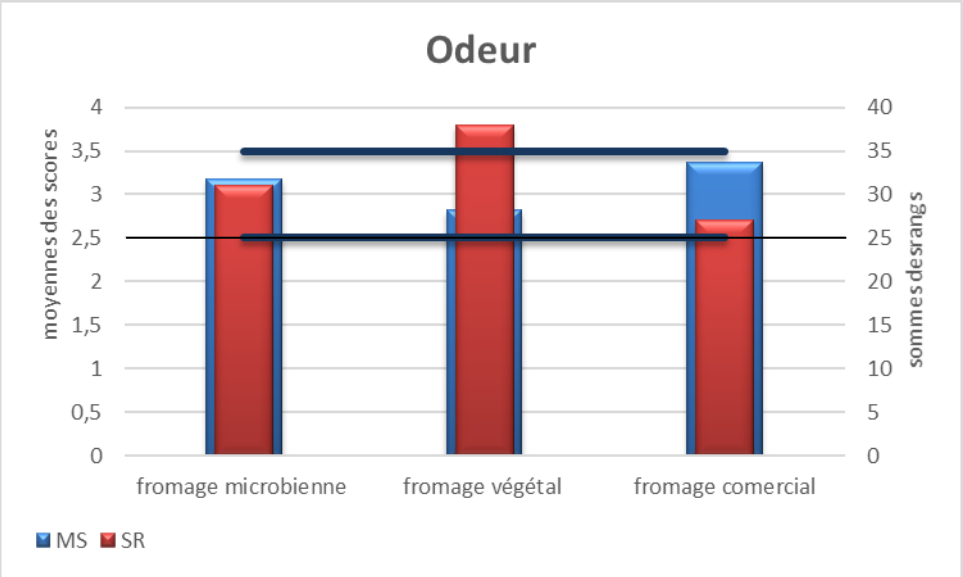


Figure 30: Histogramme des résultats des analyses d'odeur des fromages fabriqués.

Selon **la somme des rangs (SR)**, le fromage végétal se situe au-dessus de la limite supérieure de signification, il est donc statistiquement mauvais. Cependant pour fromage microbien et fromage de présure la sommes des rangs se situent dans l'intervalle de signification [25,35].

Selon **la moyenne des scores (MS)**, l'odeur du fromage présure est la mieux appréciée par les panélistes avec un score égale à 3.3.

- **Gout**

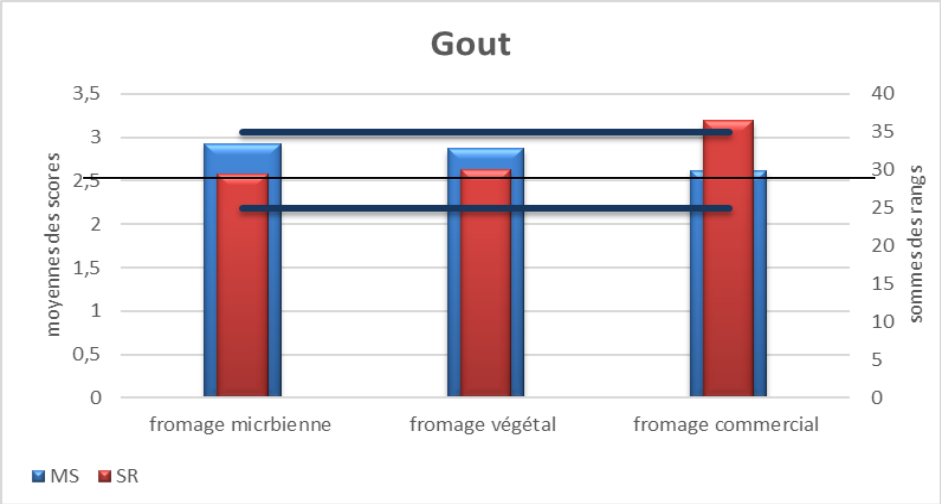


Figure 31: Histogramme d'analyse statistique du paramètre sensoriel (goût de la pâte) des différents fromages fabriqués

La somme des rangs (SR)des deux fromages microbien et végétal dans l'intervalle de signification [25,35], cela signifie qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux fromages. Cependant, pour le fromage de la présure la sommes des rangs se situe au-dessus de la limite supérieure de signification, il est donc statistiquement mauvais.

De plus, **les moyennes des scores (MS)**nées pour les trois types de fromage ne présentent pas une grande différence et sont supérieures à limite acceptable.

- **Couleur**

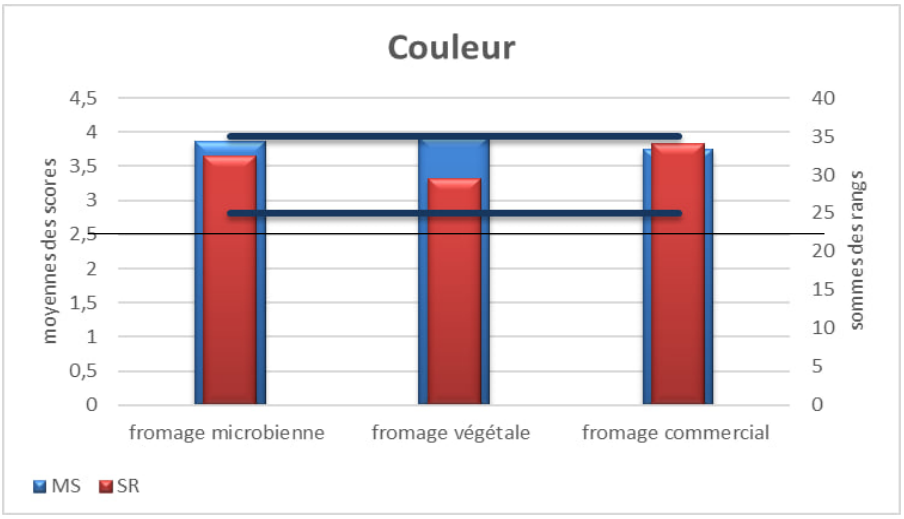


Figure 34 : Histogramme des résultats des analyses du couleur des fromages fabriqués.

La somme des rangs (SR)des trois fromages se situe dans l'intervalle de signification [25,35], cela signifie qu'il n'y a pas de différence significative en couleur entre les trois fromages.

Toutefois, **les moyennes des scores (MS)** attribuées par les panélistes aux trois types de fromage sont supérieures à limite acceptable.

Conclusion

Co0nclusion

Cette étude a permis de contribuer aux recherches existantes sur les protéases coagulant le lait et de renforcer l'idée que de nouvelles sources potentielles de succédanés de la présure traditionnelle peuvent être découvertes.

Cette étude nous a permis de caractériser deux protéases d'origine végétale (*Cynara scolymus*) et microbienne (*Bacillus subtilus* BD17) ainsi que les fromages fabriqués à partir de ces différentes coagulases, en termes de propriétés physico-chimiques et sensorielles.

L'objectif était de vérifier leur aptitude à coaguler le lait afin d'envisager leur utilisation comme substituts de la présure.

Notre expérimentation s'est articulée autour de trois volets principaux : l'extraction, la caractérisation, et la fabrication de différents échantillons de fromage en utilisant les différents extraits enzymatiques caractérisés. Dans un premier temps, l'activité coagulante et protéolytique des extraits coagulants a été déterminée sur des extraits bruts provenant des fleurs d'artichauts, et de *Bacillus subtilis* BD17.

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut a été déterminée par la méthode de Berridge, dans des conditions standard (35 °C, pH = 6,4, 0.01 M de CaCl2). En outre, l'activité protéolytique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une densité optique de 660 nm.

Les résultats obtenus montré que les extraits enzymatiques bruts (EEB) présentent des activités coagulantes plus importantes; des activités protéolytiques faibles de 0.629 DO660 et 1.078 DO660 et des indices AC/AP de 3647.05, 1194.8 élevés respectivement pour les protéases d'origine microbienne et végétale.

D'autre part, les paramètres influençant l'activité optimale de l'extrait enzymatique brut microbien ont été déterminés. L'activité optimale a été observée à une température de 75 °C, une concentration en CaCl2 de 0,1 M et un pH de 5,4. Pour l'extrait enzymatique brut végétal, l'activité optimale a été observée à une température de 65 °C, une concentration en CaCl2 de 0,1 M et un pH de 5,4.

Les résultats du rendement fromager de chaque fromage élaboré montrent que ce dernier est plus important pour le fromage préparé avec l'EEB_v (37%) et le fromage préparé avec le présure commercial (30.07%) par rapport à celui fait à base de l'EEB_m (27,51%).

Conclusion

L'évaluation sensorielle des fromages a révélé une texture, une couleur et un gout satisfaisants pour chaque fromage. Cependant, l'odeur du fromage fait à partir de l'EEBv est moins appréciée en comparaison avec les autres fromages, probablement du à l'odeur du végétal qui a affecté la qualité du produit élaboré.

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.
- Déterminer le poids moléculaire et l'homogénéité protéique des protéases microbiennes par une électrophorèse sur gel polyacrylamide.

Références bibliographiques

Abdel-Fattah, A.F., El-Hawwary, N.M. and Amr, A.S. (1974) 'Studies on the Production of Milk-clotting Enzymes, Proteolytic Enzymes and Mucilage by Fungi', *Microbiology*, 84(2), pp. 327–331.

Abdella, M.A.A., Ahmed, S.A. and Ibrahim, O.A. (2023) 'Statistical improvement of protease production from a new isolate *Bacillus thuringiensis* strain-MA8 and its application in the production of enzyme-modified cheese', *International Journal of Biological Macromolecules*,225,pp.361–375.

Abellán, A., Cayuela, JM., Pino, A., Martínez-Cachá, A., Salazar, E., Tejada, L., *(*2012) 'Free amino acid content of goat's milk cheese made with animal rennet and plant coagulant', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(8), pp. 1657–1664.

Adetunji, V.O. , Salawu, O.T. (2008) 'West African soft cheese "wara" processed with Calotropis procera and Carica papaya: A comparative assessment of nutritional values'.

AFNOR, 1986. *Contrôle de la qualité des produits laitiers : analyses physicochimiques. Ed: 3.AFNOR, ITSV, 1030p.*ml

Ahmed S. A., Wehaidy H. R., Ibrahim O. A., Abd El Ghani S., El-Hofi M. A., (2016). Novelmilk-clotting enzyme from Bacillus stearothermophilus as a coagulant in UF-white soft cheese. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 7, p.p.241–249.

Ahmed, S.A. , Helmy, W.A. (2012) 'Comparative evaluation of Bacillus licheniformis 5A5 and Aloe variegata milk-clotting enzymes', *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29, pp. 69–76.

Alirezaei M., Aminlari M., Reza Gheisari H and Tavana M., (2011). Actinidin: A promising Milk Coagulating Enzyme. European Journal of Food Research & Review 1(2), p.p. 43-51.

Alves L. S., Merheb-Dini C., Gomes E., da Silva R., & Gigante M. L., (2013). Yield, changes in proteolysis, and sensory quality of Prato cheese produced with different coagulants. Journal of Dairy Science, 96(12), p.p.7490–7499.

Aly, S. (2012) 'Optimization of Utilization of Calf Rennet and Adult Bovine Rennet Mixtures in Domiati Cheese Making', *Journal of Food and Dairy Sciences* [Preprint].

Kahlouche, A., Nouani, A . (2017) 'Characterization of a milk-clotting enzyme produced by Bacillus mojavensis P47M strain isolated from Algerian dairy farm soil', *Research Journal of Biotechnology*, 12.

Andrén, A. (2011) 'Cheese | Rennets and Coagulants', in *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, pp. 574–578. Available at: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00069-8.

Andrén, A. (2021) 'Milk-Clotting Enzymes', in A.L. Kelly and L.B. Larsen (eds) *Agents of Change: Enzymes in Milk and Dairy Products*. Cham: Springer International Publishing (Food Engineering Series), pp. 349–362. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8_14.

Auboiron, B. , Lansard, G. (1997)*La France des fromages AOC : le goût et le respect de latradition*.Édisud. Aix-en-Provence.

Badgujar, S.B., Mahajan, R.T. (2014) 'Nivulian-II a new milk clotting cysteine protease of *Euphorbia nivulia* latex', *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, pp. 391–398.

Baeyens-Volant, D., Matagne, A., El Mahyaoui, R., Wattiez, R., & Azarkan, M., (2015). A novel form of ficin from Ficus carica latex: Purification and characterization. Phytochemistry, 117, p.p.154–167.

Balabanova, T. , Vlaseva, R. (2017) 'Effect of rennet type and ripening period on chemical properties of Bulgarian white brined cheese.', *International Food Research Journal*, 24(6).

Barrett, A.J. (1994) '[1] Classification of peptidases', in *Methods in Enzymology*. Academic Press (Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases), pp. 1–15.

Beckers, J.F. (2005) 'RÉSUMÉ La caractérisation des protéases aspartiques gastriques et surtout la compréhension de leurs mécanismes d'activation permet de nombreuses applications dans des domaines variés comme l'utilisation de la chy-'.

Ben Amira A., Besbes S., Attia H., Blecker C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: a review, International Journal of Food Properties. 20 (sup1) p.p.76–93.

Benyahia Krid, F.A., Aissaoui Zitoun, O. (2016) 'Comparative Study of Milk Coagulation with Chicken Pepsin or Rennet: Interactions, Rheology and Microstructure', *Journal of Veterinary Science & Technology*, 7(5).

Berridge, N.J. (1952) 'An improved method of observing the clotting of milk containing rennin', *Journal of Dairy Research*, 19(3), pp. 328–329.

Bich Thuy, D.T., Bose, S.K. (2010) 'Characterization of Multiple Extracellular Proteases Produced by a Bacillus subtilis Strain and Identification of the Strain', *International Journal of Biology*, 3(1), p. p101.

Bravo Bolívar, M.S., Pasini, *F.*, Marzocchi, *S.*, Ravagli, C., Tedeschi, P. (2023) 'Future Perspective and Technological Innovation in Cheese Making Using Artichoke (Cynara scolymus) as Vegetable Rennet: A Review', *Foods*, 12(16), p. 3032.

Catianeo, T.M.P., Nigro, F., Messina, G., Giangiacomo, R. (1994) 'Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase'.

Champagne, C.P., Soulignac, L., Marcotte, M., Innocent, J.P. (2003) 'Texture et évolution du pH de fromages de type Brie entreposés en atmosphère contrôlée', *Le Lait*, 83(2), pp. 145–151.

Chazarra, S., Sidrach, L., López-Molina, D., Rodríguez-López, J. N.(2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (Cynara scolymus, L.) flowers. International Dairy Journal, 17(12), p.p.1393-1400.

Clark S., Costello M., Drake M. A., & Bodyfelt F. (2009). The Sensory Evaluation of Dairy Products.

Codex Alimentaire, S. (2013) 'Norme Générale Codex Pour Le Fromage'.

Collin, J.-C. (2015)*Présures et coagulants de substitution: Comment faire le bon choix ?*Quae.*Contribution on the characterization of Klila a traditional cheese in east of Algéria* (2015).

Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F., Brandelli, A. (2009) 'Keratinolytic potential of a novel *Bacillus sp*. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*', *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(3), pp. 358–363.

Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine.

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

Domsalla, A., Melzig, M.F. (2008) 'Occurrence and Properties of Proteases in Plant Latices', *Planta Medica*, 74(7), pp. 699–711.

Eeckhaut, I., Mamike, L., Caulier, G. (2024) 'Sea cucumbers and cheese making: Exploring the use of milk coagulant obtained from the digestive tract of *Holothuria scabra*', in A. Mercier et al. (eds) *The World of Sea Cucumbers*. Academic Press, pp. 611–617.

EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP), Barat Baviera, J.M., Bolognesi, C., Chesson, A., Cocconcelli, P.S., Crebelli, R., Michael Gott, D., Grob, K., Lambré, C., Lampi,E., Mengelers, M., Mortensen, A., Rivière, G., Silano, V., Steffensen, I.L., Tlustos, C., Loveren, H.V., Laurence Vernis., Holger Zorn.. (2023) 'Safety evaluation of the food enzyme rennet containing chymosin and pepsin A from the abomasum of calves and cows', *EFSA Journal*, 21(6), p. e08084.

El-Tanboly, E.-S.,El-Hofi1, M., Bahr Youssef1, Y., El-Desoki, W., Ismail1, A.(2013) 'Utilization of salt whey from Egyptian Ras (Cephalotyre) cheese in microbial milk clotting enzymes production', *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12(1), pp. 9–20.

Emmons, D.B., Petrasovits, A., Gillan, R.H. (1971) 'Cheddar Cheese Manufacture with Pepsin and Rennet1', *Canadian Institute of Food Technology Journal*, 4(1), pp. 31–37.

Esteves C.L.C., Lucey J.A., Wang T., Pires E.M.V., 2003. Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. Journal of Dairy Science, 86, p.p.2558–2567.

Esteves, C.L.C., Lucey, J.A., Pires, E.M.V. (2002) 'Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin', *International Dairy Journal*, 12(5), pp. 427–434.

Euzéby, J. (2009) 'Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire', *Revue Francophone des Laboratoires*, 2009(411), p. 17.

Evette, J.-L., Conseil International de la Langue Francaise, P. fre and Agence de Cooperation Culturelle et Technique, P. fre (1975) *La fromagerie*.

Fenelon, M.A., Guinee, T.P. (1999) 'The Effect of Milk Fat on Cheddar Cheese Yield and Its Prediction, Using Modifications of the Van Slyke Cheese Yield Formula', *Journal of Dairy Science*, 82(11), pp. 2287–2299.

Ferreiro, T., Rodríguez-Otero, J.L. (2018) 'Evolution and distribution of phospholipids in cheese and whey during the manufacturing of fresh cheese from cows' milk', *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), pp. 820–823.

Fguiri, I., Atigui, M., Sboui, A.(2021) 'Camel Milk-Clotting Using Plant Extracts as a Substitute to Commercial Rennet', *Journal of Chemistry*, 2021, p. e6680246. Available at: https://doi.org/10.1155/2021/6680246.

Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., & McSweeney P. L. H. (2017). Fundamentals of Cheese Science. Science And Technology.

***Fromage frais nature - Campagne de France - 100 g* (2016)**.

Fromager, L.B. du (2017)*Différences entre les fromages à pâte pressée et à pâte molle*, *La boite du fromager*.

García V., Rovira S., Boutoial K., Álvarez D., et López M., (2015). A comparison of the use of thistle (Cynara cardunculus L.) and artichoke (Cynara scolymus L.) aqueous extracts for milk coagulation. Dairy science & technology, p.p.1-12.

Garg, S.K., Johri, B.N. (1994) 'Rennet: Current trends and future research', *Food Reviews International*, 10(3), pp. 313–355.

Gimenes, N.C., Silveira, E. and Tambourgi, E.B. (2021) 'An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications', *Separation & Purification Reviews*, 50(3), pp. 223–243.

Green, M.L. (1977) 'Milk coagulants', *Journal of Dairy Research*, 44(1), pp. 159–188.

Guerard, F. (1985) 'Une utilisation des enzymes proteolytiques extraites des visceres de poissons: La coagulation du lait.', *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 49(3–4), pp. 199–203.

Guetouache, M., Guessas, B. (2015) 'Characterization and identification of lactic acid bacteria isolated from traditional cheese (Klila) prepared from cows milk', *African Journal of Microbiology Research*, 9(2), pp. 71–77.

Hachana, Y., Aloui, O., Fortina, R. (2021) 'Use of caprifig tree extract as a substitute for calf rennet in goat's fresh cheese production', *Small Ruminant Research*, 199, p. 106382.

Hang F.,Wang Q., Hong Q., Liu P., Wu Z., Liu Z., Hao Z., Chen W., (2016). Purification and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase from Paenibacillus spp.BD3526.International Journal of Biological Macromolecules, 85, p.p.547–554.

Harboe, M., Broe, M.L., Qvist, K.B. (2010) 'The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants', in *Technology of Cheesemaking*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 98–129.

Hashim M., Dong M., Iqbal M., Li W., et Chen X. (2011). Ginger protease used as coagulant enhances the proteolysis and sensory quality of Peshawari cheese compared to calf rennet. Dairy science & technology, 91(4), p.p.431-440

He X., Ren Z., Guo H., Zhang W., Song X., Gan B., 2011. Purification and properties of a milk clotting enzyme producedby Bacillus amyloliquefaciens D4.Korean Journal of Chemical Engineering, 28(1), p.p.203-208.

Heda, R., Toro, F., Tombazzi, C.R. (2024) 'Physiology, Pepsin', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Hosseini, S., Varidi, M. (2021) 'Optimization of Microbial Rennet Encapsulation in Alginate – Chitosan Nanoparticles', *Food Chemistry*, 352, p. 129325.

Hui, Y.H. (ed.) (2006)*Food Biochemistry and Food Processing*. 1st edn. Wiley.

Huynh, H. (2023) 'Camembert : Fromage de France et du Monde', pp. 1–108.

Jacob, M., Jaros, D. and Rohm, H. (2011) 'Recent advances in milk clotting enzymes', *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), pp. 14–33.

Kamoun P., 1977. Appareils et méthodes in biochimie. 3ème ed flammarian ; Paris.

Khattab A. R., Guirguis H. A., Tawfik S. M., & Farag M. A., (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. Trends in Food Science & Technology.

Kramer, K. (1963) 'A rapid method for determining significance of differences from rank sums', *Food Technology*, 17(12), pp. 1596–1597.

Kumar A., Sharma J., Mohanty A.K., Grover S., Batish V.K., 2006. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (Capra hircus). Biochem Molecular Biology,145, p.p.108–113.

Kumar A., Sharma J., Saharab M.R., Singb R., (2005). Extracellular acid protease2 from *Rhizopus oryzae* : purification and characterization. Elsevier Process Biochemistry, 40, p.p. 1701-1705.

Kumari Narwal, R., Bhushan B., Pal A., Panwar A., & Malhotra S. (2016). Purification, physicochemico- kinetic characterization and thermal inactivation thermodynamics of milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422. LWT - Food Science and Technology, 65, p.p.652–660

la Norme générale pour le fromage (CODEX STAN 283-1978)

Langholm Jensen, J., Mølgaard, A., Navarro Poulsen, J.C., Harboe, M.K., Simonsen , J.B., Lorentzen, A.M., Hjernø, K., van den Brink, M.J., Larsena S.(2013) 'Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(5), pp. 901–913.

Laurent, C. (1974) *Conservation des produits d'origine animale en pays chauds*.

Law, B.A., Tamime, A.Y. (2011)*Technology of Cheesemaking*. John Wiley & Sons.

Laxman R. S., Sonawane A. P., More S. V., Rao B. S., Rele M. V., Jogdand V. V., Rao M. B. 2015. Optimization and scale up of production of alkaline protease from Conidiobolus coronatus. Process Biochemistry, 40, p.p.3152–3158.

LEE, K.L., ALBEE, K.L., BERNASCONI, R.J., EDMUNDS, T. (1997) 'Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases', *Biochemical Journal*, 327(1), pp. 199–202.

Leite Júnior, B.R. de C., Tribst, A.A.L. and Cristianini, M. (2015) 'Influence of high pressure homogenization on commercial protease from *Rhizomucor miehei*: Effects on proteolytic and milk-clotting activities', *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), pp. 739–744.

Lemes A. C., Pavón Y., Lazzaroni S., Rozycki S., Brandelli A., & Kalil S. J. 2016. A new milk-clotting enzyme produced by Bacillus sp. P45 applied in cream cheese development. LWT - Food Science and Technology, 66, p.p. 217- 224.

Lenoir, J., Lamberet, G., Schmidt, J. L., & Tourneur, C. (1985). La maitrise du bioreacteur fromage. Biofutur.

Le Guide des aliments.canada;1999.

Les produits laitiers JEANTET Romain, CROGUENNEC Thomas, MAHAUT Michel, *SCHUCK Pierre, BRULÉ Gérard* (2008) *Librairie Lavoisier*.

Li, B., Arju, G., Taivosalo, A., Lints, T., Kriščiunaite, T., Vilu , R., Lyne, J., Roustel , S., McSweeney (2024) 'Proteolytic activity of three variants of fermentation-produced chymosin on sodium caseinate and during Cheddar cheese ripening', *International Dairy Journal*, 149, p. 105835.

Li, S., Delger,M., Dave,A., Singh, H., Ye ,A.(2023) 'Acid and rennet gelation properties of sheep, goat, and cow milks: Effects of processing and seasonal variation', *Journal of Dairy Science*, 106(3), pp. 1611–1625.

Li Z., Scott K., Hemar Y., & Otter D. (2018) . Protease activity of enzyme extracts from tamarillo fruit and their specific hydrolysis of bovine caseins. Food Research International, 109, p.p.380–386.

Liburdi K., Emiliani Spinelli S., Benucci I., Lombardelli C., & Esti M., (2018). A preliminary study of continuous milk coagulation using Cynara cardunculus flower extract and calf rennet immobilized on magnetic particles. Food Chemistry ; 239, p.p.157–164.

'Lignes directrices et normes pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire' .

Liu, X. *et al.* (2021) 'Advances in research on calf rennet substitutes and their effects on cheese quality', *Food Research International*, 149, p. 110704.

Llorente, B.E. *et al.* (2014) 'Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases', *Food Chemistry*, 159, pp. 55–63.

Logan, N.A., Vos, P.D. (2015) '*Bacillus*', in W.B. Whitman (ed.) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1st edn. Wiley, pp. 1–163.

Lowry O.M., Rosebrough N.J., Farr A.L., Et Randall, R.J., (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biology Chemistry. 193, p.p.265-275.

Lu, Z., Guo, W., Liu, C. (2018) 'Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*', *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(3), pp. 427–433.

Luerce, T. (2014) 'Recombinant Lactococcus lactis fails to secrete bovine chymosine', *Bioengineered* [Preprint].

LUQUET, F. (1990). Lait et produits laitiers (vache, chèvre, brebis): transformation et technologie. Techniques et documentation Lavoisier. Paris, 41-65.

Mandujano-Gonzalez V., Villa-Tanaca L., Anducho-Reyes M.A., Mercado-Flores Y., (2016). Secreted fungal aspartic proteases: a review. Rev. Iberoam. Micol. 33, p.p.76- 82.

Mazorra-Manzano, M.A., Moreno-Hernández, J.M., Ramírez-Suarez, J.C., Torres-Llanez d, M.J., González-Córdova, A.F., Vallejo-Córdoba, B., (2013). Sour Orange Citrus aurantium L. flowers: a new vegetable source of milk-clotting proteases. LWT – Food Science and Technology.

McSweeney, P.L.H. (2011) 'Cheese| biochemistry of cheese ripening'.

Meribai, A., Jenidi, R., Hammouche, Y., Bensoltane, A. (2017) 'Physico-chemical characterization and microbiological quality evaluation of klila, an artisanal hard dried cheese from Algerian's arid areas: Preliminary study', 40.

Miranda, G. *et al.* (1989) 'Hydrolysis of α-lactalbumin by chymosin and pepsin. Effect of conformation and pH', *Le Lait*, 69(6), pp. 451–459.

Mitchel, R.E.J., Chaiken, I.M., Smith, E.L. (1970) 'The Complete Amino Acid Sequence of Papain: ADDITIONS AND CORRECTIONS', *Journal of Biological Chemistry*, 245(14), pp. 3485–3492.

Mohamed Ahmed, I.A., Morishima, I., Babiker, EE., Mori, N. (2009) 'Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen', *Phytochemistry*, 70(4), pp. 483–491.

Moodie, C.P. (2001) 'Enzyme Development Corporation'.

Moreno-Hernández J. M., Hernández-Mancillas X. D., Navarrete E. L. C., Mazorra-Manzano M. Á., Osuna-Ruiz I., Rodríguez-Tirado V. A., & Salazar-Leyva J. A. 2017. Partial Characterization of the Proteolytic Properties of an Enzymatic Extract From "Aguama" Bromelia pinguin L. Fruit Grown in Mexico. Applied Biochemistry and Biotechnology, 182(1), p.p.181–196.

Moschopoulou E.E., Kandarakis I.G., Alichanidis E., Anifantakis E.M.,(2006). Purification andcharacterization of chymosin and pepsin from kid. Journal of Dairy Research, 73, p.p.49–57.

Musa, S.M. (2019) 'Food Industry: An Introduction', *International Journal of Trend in Scientific Research and Development* [Preprint].

Nel, S. (1998) 'DELA REPUBLIJQUOE UARLGNERAIELNNE ODEFMFOCIRCATIIEQULE BT POPULAIRE'.

Nicosia, F.D., Puglisi, I., Pino, A., Caggia, C., Randazz, CL..(2022) 'Plant Milk-Clotting Enzymes for Cheesemaking', *Foods*, 11(6), p. 871.

Nouani A., Morsli A., Dako E., Belhamiche N., Belbraouet S., Bellal M.M., (2009). Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (Cynara scolymus) and from the fig tree latex (Ficus carica) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. Journal of Food Technology, 7 (1), p.p.20-29.

Ordiales E., Martin A., Jose Benito M., Hernandez A., Ruiz-Moyano S., de Guia CordobaM., (2012). Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (Cynara cardunculus) used in "Torta del Casar" cheese-making. Food Chemistry. 133, p.p.227-235.

Osuna-Ruíz, I., Tiznado-Garzón, R., Salazar-Leyva, JA., Lourdes García-Magaña, M. (2023) 'Milk-Clotting and Proteolytic Properties of a Partially Purified Pepsin from Yellowfin Tuna (Thunnus albacares) and its Potential for Cheesemaking', *Food and Bioprocess Technology*, 16(8), pp. 1769–1780.

Ozturkoglu-Budak S., Wiebenga A., Bron P. A., & de Vries R. P., (2016). Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. International Journal of Food Microbiology, 237, p.p.17-27.

Palma, J.M., Sandalio, LM., Corpas, FJ., Romero-Puertas, MC., McCarthy, I., del Río, LA. (2002) 'Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes', *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6), pp. 521–530.

Pardo, M.F., López, LMI., Canals, F., Avilés, FX., Natalucci,CL., Caffini, N. (2000) 'Purification of Balansain I, an Endopeptidase from Unripe Fruits of Bromelia balansae Mez (Bromeliaceae)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), pp. 3795–3800.

Patel A. R., Mokashe N. U., Chaudhari D. S., Jadhav A. G., Patil U. K., (2019). Productionoptimisation and characterisation of extracellular protease secreted by newly isolated Bacillus subtilisAU-2 strain obtained from Tribolium castaneum gut. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.

Penasse L. (1974)*Les enzymes : cinétique et mécanisme d'action*. Masson et Cie.

Plas, S. (2023) 'La Guerre du reblochon / Sandy Plas', *La Guerre du reblochon / Sandy Plas* [Preprint].

Poza M., Sieiro C., Carreira L., Baross-Velazquez J., Villa T.G., (2003). Production and

Characterization of the Milk-Clotting Protease of Myxococcus Xanthus Strain 422, Indian Journal of Biotechnology, 30, p.p. 691-698

Product Focus Truth, Lies and Feta The Cheese that Launched a (Trade) War (2009).

Rajagopalan, A., Sukumaran, B.O. (2018) 'Three phase partitioning to concentrate milk clotting proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br and its characterization', *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, pp. 279–288.

Ramet, J.P. (1997) 'Technologie comparée des différents types de caillé', *Le fromage*, pp. 333–364.

Rao, L.K., Mathur, D.K. (1975) 'Studies on the production of bacterial rennet in a pilot plant fermentor', *Biotechnology and Bioengineering*, 17(9), pp. 1349–1361.

Rao, M.B., Tanksale, AM., Ghatge, MS., Deshpande, VV. (1998) 'Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), pp. 597–635.

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

Van Rooijen G., Glenn K.R., Shen Y., Boothe J. (2008). Commercial production of chymosin in plants, Google Patents.

Roseiro L. B., Barbosa M., Ames J. M., & Wilbey R. A., (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants the use of Cynara L. for the production of ovine milk cheeses. International Journal of Dairy Technology, 56, p.p.76–85.

Sampaio, P.N., Pais, M.S., Fonseca, L.P. (2014) 'A novel fed-batch based strategy for enhancing cell-density and recombinant cyprosin B production in bioreactors', *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(12), pp. 2515–2527.

Sarmento A. C., Lopes H., Oliveira C. S., Vitorino R., Samyn B., Sergeant K., Barros M. T., (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from Cynara cardunculus L.. Planta, 230, p.p.429-439.

Sarwar, A. (2019) 'Change of proteolysis and sensory profile during ripening of Cheddar-style cheese as influenced by a microbial rennet from rice wine', *Food Science & Nutrition* [Preprint].

Schallmey, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004) 'Developments in the use of Bacillus species for industrial production', *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), pp. 1–17.

Shah, M.A., Mir, S.A., Paray, M.A. (2014) 'Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review', *Dairy Science & Technology*, 94(1), pp. 5–16.

Shi, Y., Prabakusuma, A.S., Zhao, Q., Wang, X., Huang, A., (2019). Proteomic analysis of Moringa oleifera Lam. leaf extract provides insights into milk-clotting proteases, LWT - Food Science and Technology.

Shieh, C.-J., Phan Thi, L.-A., Shih, I.-L. (2009) 'Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto', *Biochemical Engineering Journal*, 43(1), pp. 85–91.

Siboukeur, O., Mati, A., Hessas, B. (2005) 'Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait cameline (Camelus dromedarius) : utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires'.

Silva B. L., Geraldes F. M., Murari C. S., Gomes E. and Da-Silva R. (2014) . Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus Thermomucor indicae-seudaticae N31, Applied biochemical and biotechnology, 172, 1999.

Da Silva R. R., De Oliveira L. C. G., Juliano M. A., Juliano L., De Oliveira A. H. C.,Rosa, J.C., & Cabral, H., (2017). Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus Phanerochaete chrysosporium. Food Chemistry, 225, p.p.45-54.

Sirtori, L. R., Cladera-Olivera, F., Lorenzini, D. M., Tsai, S. M., & Brandelli, A. (2006).

Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by Bacillus sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish Piaractus mesopotamicus. Journal of General and Applied Microbiology, 52, p.p.357-363.

Smith, J.L., Billings, G.E. and Yada, R.Y. (1991) 'Chemical Modification of Amino Groups in Mucor miehei Aspartyl Proteinase, Porcine Pepsin, and Chymosin. I. Structure and Function', *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(8), pp. 2009–2016.

Souza P. M., Werneck G., Aliakbarian B., Siqueira F., Ferreira Filho E. X., Perego P., JuniorA. P. (2017) . Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. Food and Chemical Toxicology, 109, p.p.1103-1110.

Thieulin, G. (1976) 'Technologie du lait (constitution, récolte et transformation) par R. Veisseyre', *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 129(2), pp. 171–172.

Tsouli, J. (1974) 'Etude comparée de l'activité enzymatique de 3 variétés d'artichauts du genre Cinara Carduncu/us L sur la coagulation du lait'.

Vandeweghe, J. (1987)*[Yield in cheese. Predetermination and measurement]*.

Vishwanatha, K.S., Appu Rao, A.G., Singh, S.A. (2009) 'Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341', *Food Chemistry*, 114(2), pp. 402–407.

Wangoh, J., Farah, Z.,Puhan, Z. (1993) 'Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract'.

Wehaidy H. R., Abdel-Naby M. A., Shousha W. G., Elmallah M. I. Y., & Shawky M. M. (2018). Improving the catalytic, kinetic and thermodynamic properties of *Bacillus subtilis* KU710517 milk clotting enzyme via conjugation with polyethylene glycol. International Journal of Biological Macromolecules, 111, p.p.296–301.

Wehaidy, H.R., Abdel-Naby, MA., Kholif, AMM., Elaaser, M., Bahgaat, WK., Wahab, WAA. (2023) 'The catalytic and kinetic characterization of Bacillus subtilis MK775302 milk clotting enzyme: comparison with calf rennet as a coagulant in white soft cheese manufacture', *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), p. 61.

Wu, F.-C., Chang, C.-W., Shih, I.-L. (2013) 'Optimization of the production and characterization of milk clotting enzymes by Bacillus subtilis natto', *SpringerPlus*, 2(1), p. 33.

Yamashita T., Higashi S., Higashi T., Machida H., Iwasaki S., Nishiyama M. and Beppu T., (1994). Mutation of a fungal aspartic protease, Mucor pusillus rennin, to decrease thermostability for use as a milk coagulant. Journal of Biotechnology, 32, p.p.17–28.

Yegin S., Fernandez-Lahore M., Jose Gama Salgado A., Guvenc U., Goksungur Y., TariC., (2011). Aspartic proteinases from Mucor spp. in cheese manufacturing. Applied Microbiology and Biotechnology, 89, p.p.949-960.

Yegin, S., Dekker, P. (2013) 'Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering', *Dairy Science & Technology*, 93(6), pp. 565–594.

Yegin, S., Goksungur, Y., Fernandez-Lahore, M. (2012) 'Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of Mucor mucedo DSM 809', *Food Chemistry*, 133(4), pp. 1312–1319.

Zhang, Y., Xia, Y., Liu, X., Xiong, Z., Wang, S., Zhang, N., Ai, L. (2019) 'High-Level Expression and Substrate-Binding Region Modification of a Novel BL312 Milk-Clotting Enzyme To Enhance the Ratio of Milk-Clotting Activity to Proteolytic Activity', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(49), pp. 13684–13693.

Zhang, Z., Qiao, H., Zhang, W. (2021) 'Enzyme Properties of Milk-Clotting Enzyme from A Newly Isolated Bacillus Licheniformis D3.1', 1(1).

Zhi N.-N., Zong K., Thakur K., Qu J., Shi J.-J., Yang J.L., (2018). Development of a dynamic prediction model for shelf-life evaluation of yogurt by using physicochemical, microbiological and sensory parameters. CyTA - Journal of Food, 16(1), 42–49.

Annexes

Annexe 1

Le protocole de la coloration de Gram :

1. Réaliser un frottis et fixer la bactérie.
2. Plonger la lame dans le violet de gentiane (ou cristal violet) phénique pendant 1 min.
3. Laver la lame avec de l'eau distillée.
4. Plonger la lame dans une solution de Lugol pendant 1 min.
5. Laver avec de l'eau distillée.
6. Décolorer pendant dix secondes avec de l'alcool (éthanol).
7. Rincer immédiatement avec de l'eau distillée.
8. Plonger la lame dans la fuchsine phénique pendant 1 min.
9. Laver la lame avec de l'eau distillée.
10. Sécher la lame en la tamponnant avec du papier.
11. Observer à l'objectif x 100 à l'immersion dans l'huile.

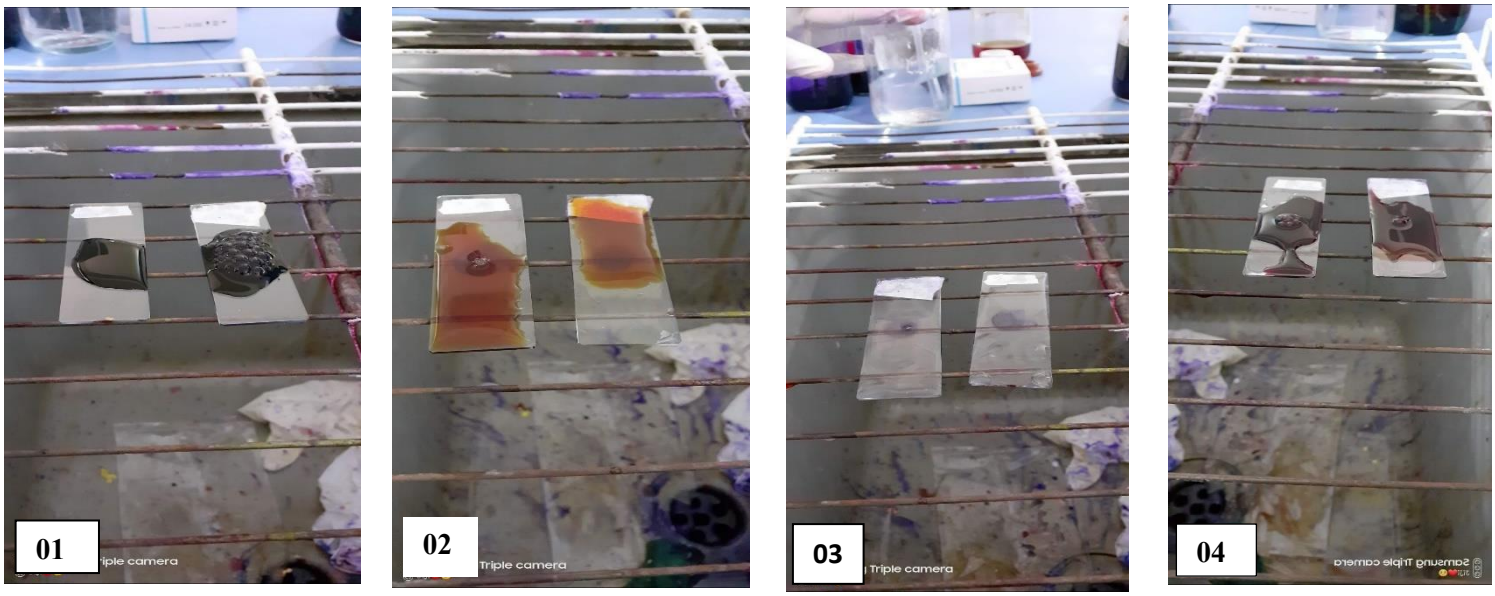
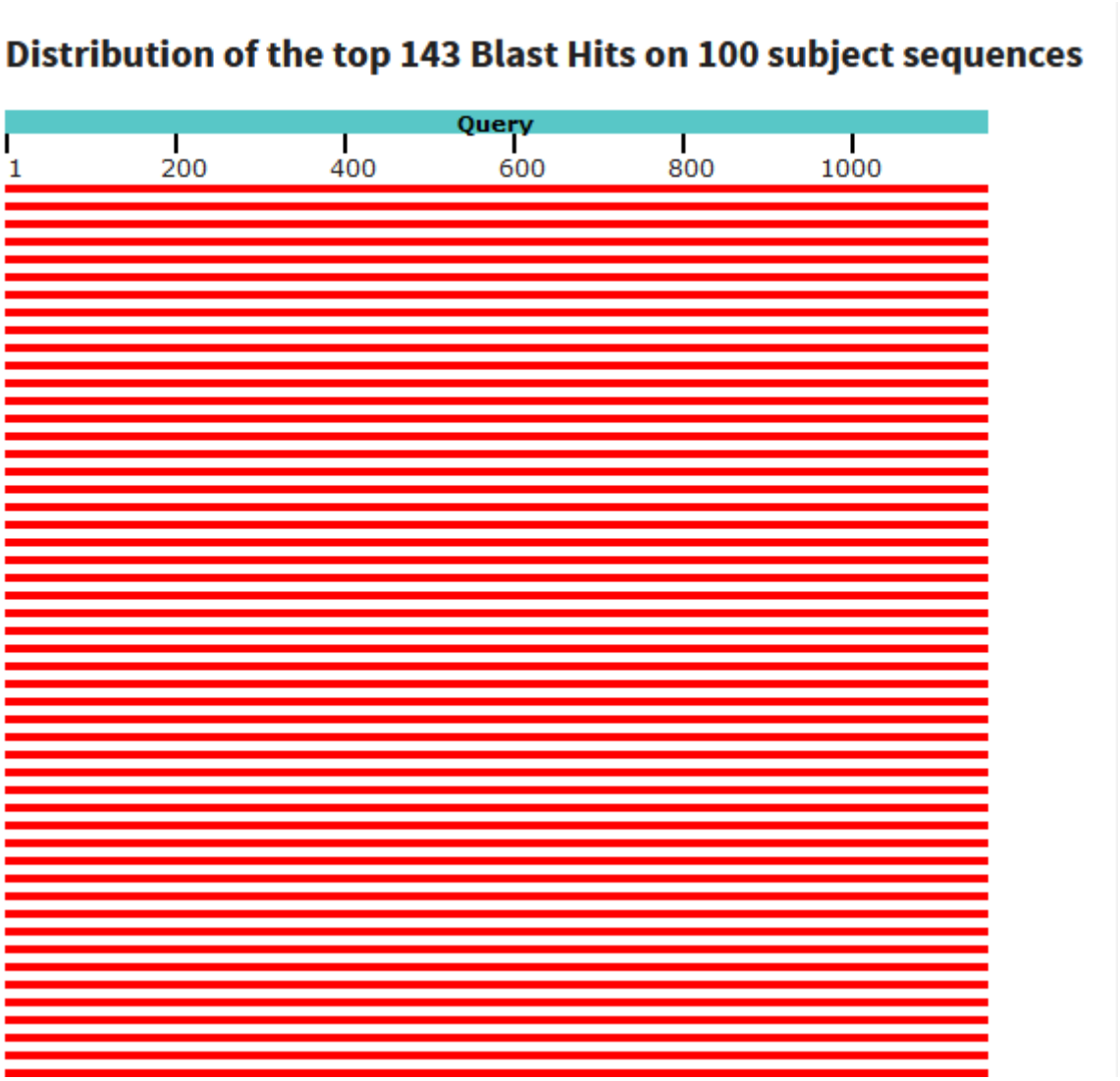


Figure n°01 : les étapes de la coloration deGram

Annexe 2

Résultats FASTA



Annexe 3

Préparation de solution tampon **(Kamoun, 1977)**

La solution tampon acétate de sodium (pH=5.4, 0.1M) est préparée comme suit : (pour 100ml de solution tampon) :

- **Solution A :** acétate de sodium (C2H3O2Na) à 0.1 N (8.204g/l).
- **Solution B :** acide acétique à 0.1 N (6.005g/l).

Mélanger : **67.8ml de A+ (100-67.8) de B**.

Annexe 4

Préparation de substrat de Berridge (COLLIN et al., 1977)

Les constituants du substrat de Berridge

- **Le lait en poudre**

Le lait en poudre utilisé est de type LOW-HEAT obtenu à d'un lait écrémé pasteurisé de bonne qualité bactériologique (moins de 5000 germes/ml).

C'est une poudre n'ayant subi qu'un chauffage faible qui entraine un respect de l'état physicochimique de protéines solubles du sérum, elle est réservée dans des boites métalliques dans un endroit non humide.

- **Solution de $CaCl_2$**

La solution de CaCl2 de qualité anhydre utilisée à une concentration de 0,01M, la solution est conservée à +4°C à l'obscurité.

- **Mode opératoire**

Pour préparer 100ml de substrat de Berridge, on dissout 12g de lait en poudre dans 100ml de CaCl2 à0,01M. On verse une petite quantité de solution sur la totalité de la poudre de façon à obtenir par agitation manuelle une bouillé homogène, le reste de la solution CaCl2 chlorure de calcium est alors ajoutée sur cette bouillé, puis agité par un agitateur magnétique douce pendant 30mn. Le pH du lait ainsi préparé est ajusté à pH=6,4 avec une solution de HCL 1N ou NaOH 1N. Le substrat est prêt l'emploi et conserver au réfrigérateur.

Annexe 6

Préparation de la courbe étalon BSA

1. Dosage des protéines totales **(Lowry *et 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 ;

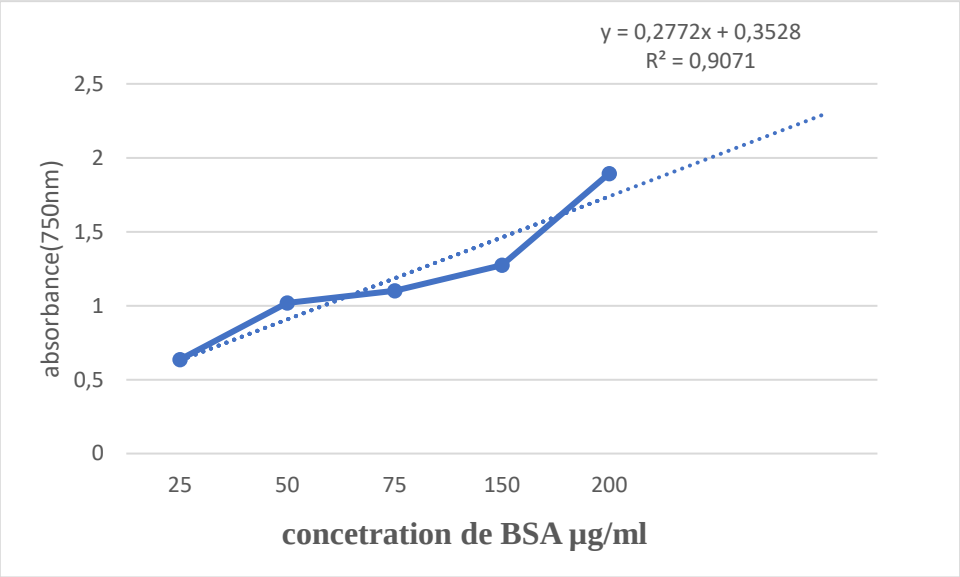
Solution étalon : A partir de la solution de sérum albumine bovine (BSA) mère à200µg/ml, préparer des dilutions de concentrations croissantes : 25, 50, 75, 150,200µg/ml.

- 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.



Courbe étalon de la B.S.A

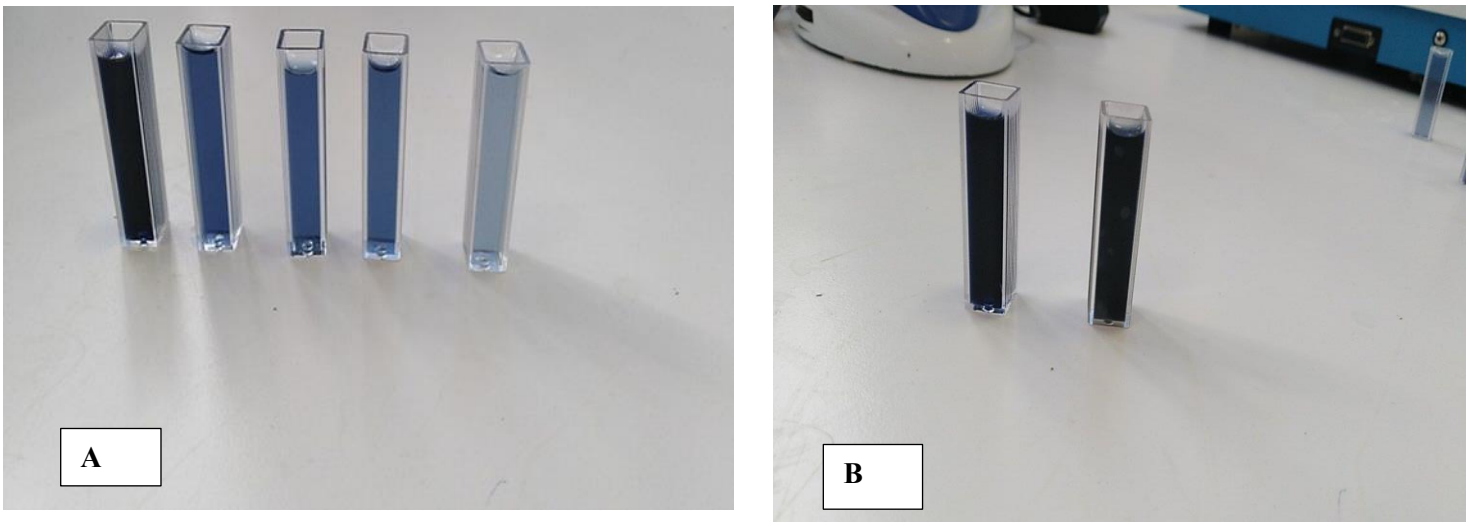


Figure n°02 : mesurer l'absorbance des solutions pour préparer courbe d'étalonnage

2.A les différentes dilutions du solution B.S.A.

2.B les deux cuves des EEB.

Annexe 7

Analyses physicochimiques du fromage

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

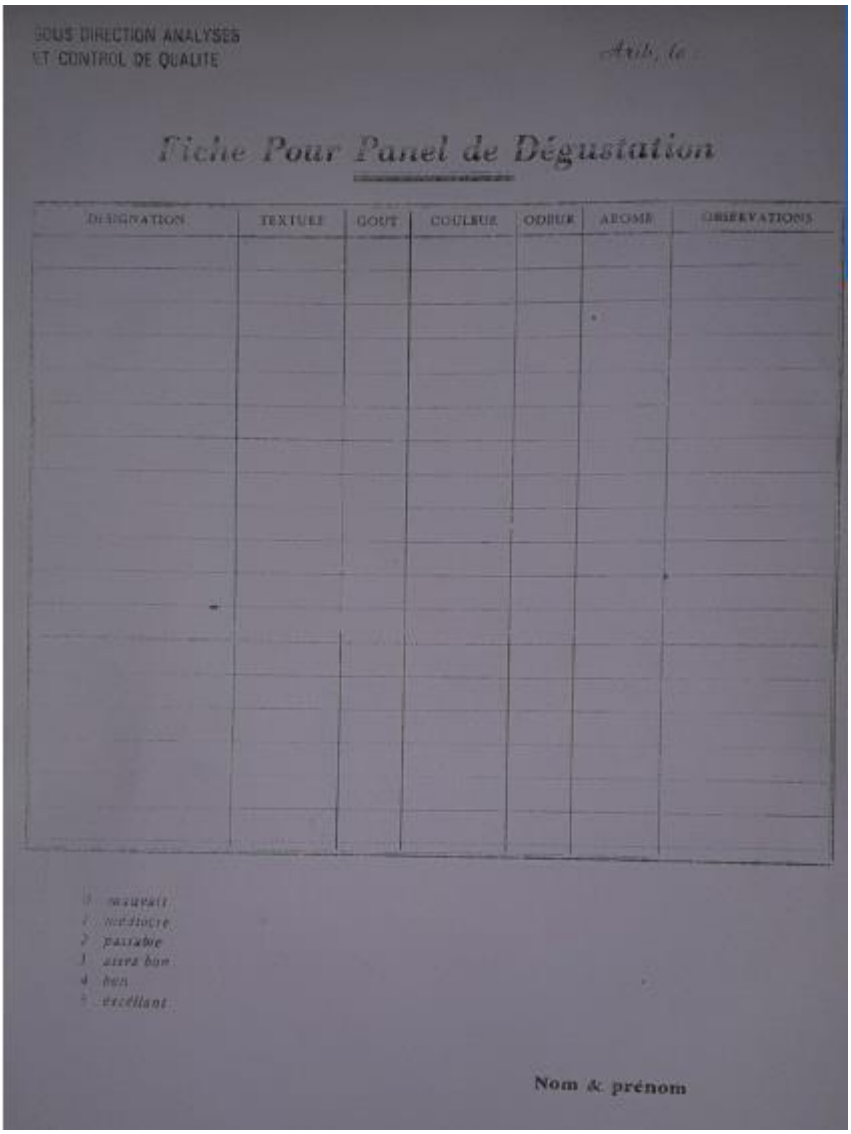
- **Mode opératoire**

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).

Annexe 8

FICHE DE DEGUSTATION



SOUS DIRECTION ANALYSES
ET CONTROL DE QUALITE

Arib, le

Fiche Pour Panel de Dégustation

DESIGNATION	TEXTURE	GOUT	COULEUR	ODEUR	AROME	OBSERVATIONS

0 mauvais
1 médiocre
2 passable
3 assez bon
4 bon
5 excellent

Nom & prénom

Annexe 9

Des analyses physicochimiques ont 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 : Où :

EST : extrait sec total

MG : matière grasse

EST= (la densité -1) x 2665+(MGx1.2)

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)** 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.

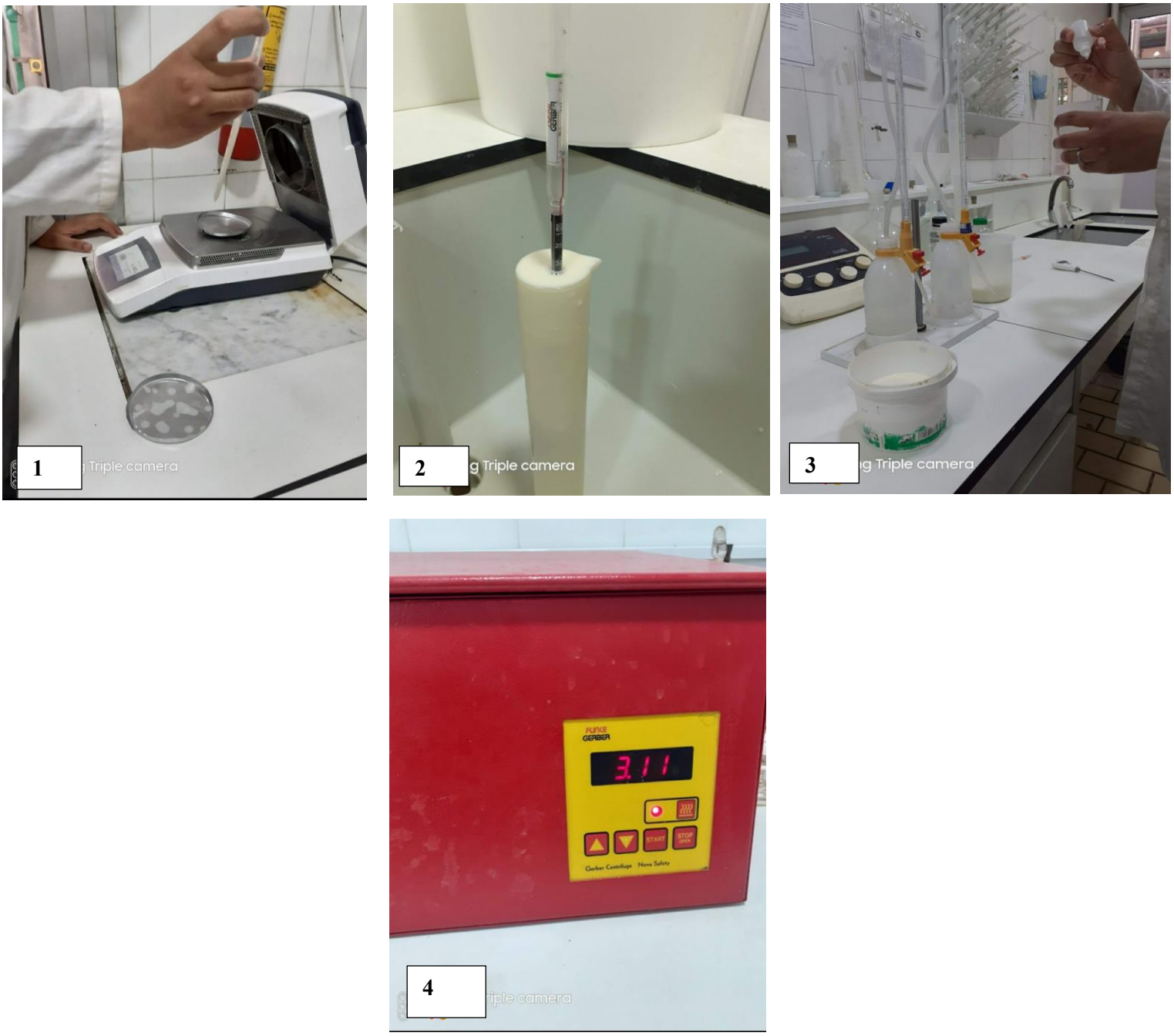


Figure n° 03 : mesure des paramètres physico-chimiques du lait

F3/1 : mesure de l'extrait sec total à l'aide d'un dessiccateur.

F3/2 : Détermination de la densité du lait.

F3/3 : mesure d'acidité du lait**. ; F4/4 :** mesure taux de matière graisse du lait.

Annexe 10

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 11

Les analyses microbiologiques

1. L'échantillonnage

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

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

2. Préparation des dilutions décimales

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

3. Les germes recherchés pour cette denrée et leurs dénombrements

- Ø Les *Staphylococcus* aureus
- Ø *Clostridium.*
- Ø les *Salmonelles.*
- Ø Les Coliformes totaux.

a. Coliformes totaux

Sont des indicateurs de qualité hygiénique. Après la préparation des dilutions à partir de l'ben et l'eau physiologique

On prend 1ml de solution et le déposer dans un boite pétrie vide puis recouvrir par une couche de 12 à 15ml de milieu VRBG (on assure que la gélose ne doit pas être très chaude pour ne pas tuer les micro-organismes). Le mélange est homogénéisé par des mouvements de huit. On ajoute la deuxième couche de VRBG après avoir laissé la première se solidifier, ce qui aura Pour effet d'immobiliser les bactéries et donc de former des colonies bien définies (colonies rouge violette de diamètre de 0.5mm).

L'Incubation : se fait à 30-37°C pendant 24h

b. Clostridium

On prend 1ml de solution et le déposer dans un boite pétrie vide puis recouvrir par une couche de 12 à 15ml de milieu VF. Les colonies peuvent être irrégulières et souvent convexes les bords des colonies sont habituellement irréguliers, parfois filamenteux. La couleur des colonies peut varier du blanc au grisâtre.

L'incubation : se fait à 37°C pendant 18h/24h/48h.

c. Les salmonella

La recherche de Salmonella a été faite en 3 étapes : le pré-enrichissement, l'enrichissement et l'isolement

1. **Le pré-enrichissement :**

Echantillon plus l'eau Peptonée tamponné placée dans l'étuve à 37°C pendant 20 heures. Ceci permet aux salmonelles de se multiplier ; elles deviennent ainsi facilement détectables par la suite

2. Enrichissement :

Dans un tube stérile qui contient 10 ml de bouillon de Rappaport de Vassiliadis (RV), nous mettons 0,1 ml de subculture (de pré-enrechissement) à l'aide d'une pipette stérile.

2.Isolement :

Elles sont ensemencées par technique de stries d'épuisement à partir d'un même bouillon sur milieu SS

L'incubation : à l'étuve 37°C pendant 24 heures.

- Après 24 heures, les colonies isolées sur les géloses présentant les caractéristiques macroscopiques des salmonelles : Colonies incolores à centre noir sur SS et colonies.

d. Les Staphylococcus aureus

0,1ml de la dilution 10^{-4}est étalé sur milieu Baird Parker.

L'incubation : à l'étuve 37°C pendant 24h.

- Colonies sont généralement rondes et bien définies. Les colonies apparaissent généralement noires ou gris foncé en raison de la réduction du tellurite de potassium présent dans le milieu.

Annexe 12

Paramètres sensoriels du fromage

- **Texture**

	F_m		F_v		F_p	
Panélistes	**Score**	**Rang**	**Score**	**Rang**	**Score**	**Rang**
1	4	1	2	2.5	2	2.5
2	4	1	3	2	1	3
3	2	1	1	2.5	1	2.5
4	1	3	4	1	3	2
5	3	2	4	1	1	3
6	2	2	3	1	1	3
7	4	2.5	5	1	4	2.5
8	2	2.5	4	1	2	2.5
9	4	2	4	2	4	2
10	4	1	2	2.5	2	2.5
11	3	2.5	3	2.5	4	1
12	1	2.5	3	1	1	2.5
13	3	2.5	3	2.5	4	1
14	3	2	3	2	3	2
15	1	2.5	1	2.5	2	1
16	2	3	3	2	4	1
Moyennes des scores	2.68		3		2.43	
Sommes des rangs	33		29		34	

- **Gout**

	F_v		F_m		F_p	
Panélistes	**Score**	**Rang**	**Score**	**Rang**	**Score**	**Rang**
1	4	1	2	2.5	2	2.5
2	4	2	4	2	4	2
3	3	1	2	2	1	3
4	3	2	2	3	4	1
5	3	1	2	2.5	2	2.5
6	2	2	3	1	1	3
7	3	1.5	3	1.5	2	3
8	2	2.5	4	1	2	2.5
9	3	1.5	3	1.5	2	3
10	3	1.5	3	1.5	2	3
11	3	2.5	4	1	3	2.5
12	2	3	4	1.5	4	1.5
13	2	3	3	2	4	1
14	3	2	1	3	4	1
15	3	2	3	2	3	2
16	4	1	3	2	2	3
Moyennes des scores	2.93		2.87		2.62	
Sommes des rangs	29.5		30		36.5	

- **Couleur**

	F_m		F_v		F_p	
Panélistes	**Score**	**Rang**	**Score**	**Rang**	**Score**	**Rang**
1	4	2	4	2	4	2
2	4	2.5	5	1	4	2.5
3	3	2	2	3	4	1
4	2	2.5	3	1	2	2.5
5	4	2	4	2	4	2
6	3	2	3	2	3	2
7	4	2	4	2	4	2
8	5	1	4	2.5	4	2.5
9	3	3	4	1.5	4	1.5
10	4	1.5	2	3	4	1.5
11	4	2.5	4	2.5	5	1
12	4	2.5	5	1	4	2.5
13	5	1.5	5	1.5	4	3
14	4	2	5	1	3	3
15	5	1.5	5	1.5	3	3
16	4	2	4	2	4	2
Moyennes des scores	3.87		3.93		3.75	
Sommes des rangs	32.5		29.5		34	

- **Odeur**

	F_m		F_v		F_p	
Panélistes	**Score**	**Rang**	**Score**	**Rang**	**Score**	**Rang**
1	4	2	4	2	4	2
2	3	2	2	3	4	1
3	3	2	2	3	4	1
4	1	2.5	1	2.5	2	1
5	3	2	2	3	4	1
6	2	2	2	2	2	2
7	4	2	4	2	4	2
8	3	2	3	2	3	2
9	4	2.5	4	2.5	5	1
10	4	1.5	3	3	4	1.5
11	3	2	2	3	4	1
12	2	2	2	2	2	2
13	3	2	3	2	3	2
14	4	1.5	4	1.5	3	3
15	3	1.5	2	3	3	1.5
16	5	1.5	5	1.5	3	1.5
Moyennes des scores	3.18		2.81		3.37	
Sommes des rangs	31		38		27	

- **Arome**

	F_m		F_v		F_p	
Panélistes	**Score**	**Rang**	**Score**	**Rang**	**Score**	**Rang**
1	4	1	3	2	2	3
2	2	2	2	2	2	2
3	2	1.5	2	1.5	1	3
4	2	3	3	1.5	3	1.5
5	3	1.5	3	1.5	2	3
6	2	1.5	2	1.5	1	3
7	3	2.5	4	1	3	2.5
8	2	2.5	3	1	2	2.5
9	3	2	4	1	2	3
10	4	1.5	3	3	4	1.5
11	4	1.5	3	3	4	1.5
12	4	2	3	3	5	1
13	5	1	4	2.5	4	2.5
14	3	1.5	3	1.5	2	3
15	4	1.5	4	1.5	3	3
16	4	1.5	3	.	4	1.5
Moyennes des scores	3.13		3.06		2.66	
Sommes des rangs	25		27.5		35.5	

Les appareils utilisés :



Photo 01 : pH-mètres



photo 02 : spectrophotomètre UV- visible

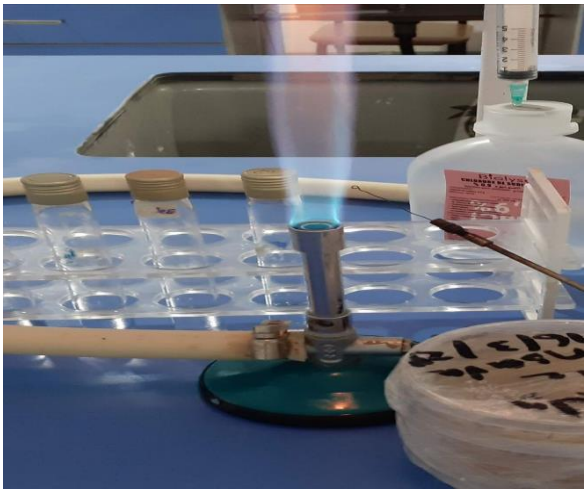


Photo 03: Bec Bunsen



photo 04 : dessiccateur



photo 05: stomacher 400 circulator.



Photo 06: centrifuge refrigeree.

- Microscope optique.
- Incubateur agitatteur.
- Balance.
- L'étuve.