MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT 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***

THEME

Identification d'une souche productrice de protéase isolée du sol d'une laiterie en vue de son utilisation pour la fabrication d'un fromage .

Présentée : par

- HOSNI Feriel **-KHOKHI Noura** **–BENOMIER Nossaiba**

- Devant le jury composé de :

Mr. : **CHAMI.B**	MAA	université Médéa	Examinateur 1
Mr. : **BOUHRAMA.A**	MCB	université Médéa	Examinateur 2
Meme. : **BOUMEDIENE.F**	MCB	université Médéa	Promotrice

Année Universitaire 2021 - 2022

Remerciements

Nous remercions Allah le clément et le miséricordieux de nous avoir aidé durant toute notre scolarité et sur lequel nous comptons tous pour atteindre notre but inchaa Allah.

Nous témoignons notre reconnaissance à notre encadreur:

***Mme Boumediene Farida,** pour la qualité de son encadrement, l'aide précieuse qu'il m'a apportée, ses conseils éclairés et les remarques constructives tout au long de la préparation de ce mémoire.*

Nous exprimons toute notre gratitude aux membres de jury

*Mme **Bouhrama Amina** de bien vouloir accepter la présidence de jury, Président, M **Chami** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Nous exprimons également nos chaleureux remerciements à: tous les membres de laboratoire de SNV techniciens et ingénieurs, 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

Grace à mon dieu…

Je termine ce mémoire la, qui est la finalité de cinq longues années d'études

Je dédie ce travail à celle qui m'a donné la vie,

Qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à

Ma **mère** , le symbole de tendresse.

« J'espère ma mère que je serai toujours à la

Hauteur de tes attentes »

A mon cher **père**, un homme qui a vécu pour sa famille.

« J'espère mon père que tu es fier de moi »

A Ma chére sœur **sara** et son mari **oussama** et **Hadil** et mes

chéres fréres **khalil** et **abd Eldjalil**

A mon mari Abd elhak ferd et toute la famille sans oublier **zineb** et **amira et** bien sur **ma tante** et **ses enfants** et **ma tante**

A mes chères amies surtout ma binome **noura** et **selma** , pour leurs encouragement permanent, et leurs soutien morale.

A le docteur yedreg de laboratoire médicale

A tous ceux qui m'ont soutenu pour atteindre ce niveau.

A toutes mes chères amies et touts **les étudiants de 2 éme années**

master microbiologie appliqué

Sans oublier

Surtout mon encadreuse **Boumediene farida**
A tous qui mon aidé pour atteindre ce niveau .

Feriel

Dédicaces

Grace Allah…

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents qui m'ont aidé à suivre le chemin de la science, qui m'ont encouragé durant toute ma vie à m'abreuver à la source des connaissances et qui n'ont pas cessé de sacrifier leur bien être pour ma réussite et mon bonheur. Et je souhaite que dieu les perpétue et les gardé en bonne santé et leur prête une longue vie pleine de bonheur, santé et de prospérité.

A mes chèrs frères : Dr : imade Edinne Mohamed Aymen merbah ses enfants ; ânes et sifo

pour leur

soutien et encouragements sans limite.

A ma chère sœurs Tinhinan et ses enfants iyad et djawed et son mari

A toute ma famille.

A toutes mes amies surtout ma binôme fériel

A toutes mes chères amies et touts les étudiants de 2 éme années master microbiologie appliqué .Sans oublier surtout mon encadreuse Boumediene farida , A tous qui mon aidé pour atteindre ce niveau .

Dédicaces

Quand il ya le souci de réaliser un Dessin Tout devient facile pour arriver à nos fins

Ce mémoire présente plus que de simples travaux, ce mémoire est la finalité de cinq longues années d'études. C'est un moment de plaisir à :

À la lumière de mes jours à la source de mes efforts ma vie et mon bonheur mon chère père.

Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serais demain et je ferais toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir, je te dédie ce modeste travail pour tes encouragements, ta présence, tu étais ma motivation et mon idole.

À ma mère qui à œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutient, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, tu es pour moi le symbole de la bonté.

À ma chère sœur Soumia

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'amour et l'affection que je porte pour toi……. Mon abri et ma sécurité. Ma fidèle accompagnante dans tous les moments.

À ma belle mère et mon beau père

Qui m'ont toujours aidé, écouté, soutenu et encouragé, je souhaite que Dieu vous protège et vous donne une bonne santé.

À mon amie Roumaissa et Selma Hafairi Ingénieur laborantin, pour leurs encouragement permanent, et leurs soutien morale.

Et une dédicace spéciale à la FAMILLE BENOMIER

Ainsi que mon Mari ;Qui était toujours avec moi par ses conseils et son soutient moral, et m'a toujours encourager gardé confiance malgré mes doutes, merci pour tant de patience et de force ; À Professeur OUMOUNA

Aucun dédicaces ne saurait exprimer mon grand respect et ma profonde estime. Je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Que Dieu vous garde.

À mes princesses nièces Tasnime et Kouttouf.

À mes professeurs dans les cycles de ma scolarité qui m'ont éclairé la voie de savoir.

À mes trinômes FERIEL et NORA, merci pour votre aide et collaboration.

Noussaiba

Résumé

RESUME :

L'objectif de notre travail consiste dans un première temps à isoler des microorganisme provenant de la terre prélevée à proximité d'une laiterie située à BOUSKEN (MEDEA) le milieu utilisé est le PCA contenant 10%de lait écrémé stérile au quel on ajouté 2% de l'amidaze .

Les bactéries sont cultivées dans un milieu contenant 05% de son blé 0.3 d'extrait de levure 0.4% de glucose 0.2% de caséine 0.3% $Na_{2H}po_4$ c'est un milieu qui a été adopté dans des travaux précédent pour la culture *Bacillus*

L'incubation à lieu 30C° pendant 24 h sous agitation 110 rmper l'extraction de l'enzyme s'effectue après filtration du milieu sur un tissu (papier filtre).

Le filtre subit une centrifugation à 4 C° pendant 30min.

Après avoir testé plusieurs souches nous avons sélectionné une souche *BACILLUS SUBTILIS*. La souche à été sélectionné par rapport a son activité coagulante très satisfaisant.

Nous avons réalisé deux plan d'expérience type composite centre pour le premier la composition du milieu de production et de 05% de son de blé 0.3 % d'extrait de levure 0.3 % d'$Na_2HPO_4$0.05 de glucose 1.01 de caséine et a T 35°C l'agitation est à 200 VPM. Un deuxième plan nous a donné : 7% son de blé 0.094% caséine 0.3 % d'extrait de levure 0.3% d'Na_2HPO_4 température est a 40°C est l'agitation est de 150 VPM l'activité coagulant est 2.82up/l. l'activité protéolytique est de Lors de la fermentation la croissance est suivie par dénombrent des colonies en milieu PCA après des dilutions successive Puis coagulante est mesuré .

La production de l'enzyme au lieu en fin de phase exponentielle et augmente avec la phase stationnaire.

Mot clé : enzyme coagulant, bacillus subtilis ,activité coagulant , activité protéolytique,

Fermentation

Résumé

تلخيص :

يتمثل الهدف من عملنا مبدئيًا في عزل الكائنات الحية الدقيقة عن التربة المأخوذة بالقرب من مصنع ألبان يقع في بلدية بوسكن ، والوسيط المستخدم هو PCA الذي يحتوي على 10٪ حليب معقم منزوع الدسم يضاف إليه 2٪ أميداز.

تُزرع البكتيريا في وسط يحتوي على 05٪ من قمحها 0.3 من مستخلص الخميرة 0.4٪ غلوكوز 0.2٪ من الكازين 0.3٪ NaHpo4 وهو وسيط تم استخدامه في الأعمال السابقة لاستزراع العصيات تتم الحضانة عند 30 درجة مئوية لمدة 24 ساعة مع الرج عند 110 دورة في الدقيقة ، ويتم استخلاص الإنزيم بعد ترشيح الوسط على قطعة قماش (ورق ترشيح).

المرشح يخضع للطرد المركزي عند 4 درجات مئوية لمدة 30 دقيقة.

بعد اختبار عدة سلالات اخترنا سلالة *BACILLUS SUBTILIS* تم اختيار السلالة لنشاطها المخثر المرضي للغاية.

قمنا بتنفيذ خطتين للتجربة من النوع المركب المركز الأول لتكوين وسط الإنتاج و 05٪ نخالة القمح 0.3٪ مستخلص الخميرة 0.3٪ Na2Hpo40.05 جلوكوز 1.01 كازين و 35 T درجة مئوية التحريك عند 200 جزء في الدقيقة. أعطتنا الطلقة الثانية: 7٪ نخالة القمح 0.094٪ كازين 0.3٪ مستخلص الخميرة 0.3٪ Na2hpo4 درجة الحرارة 40 درجة مئوية مع التحريك 150 vpm نشاط التخثر 12.82. / up. النشاط التحلل للبروتين هو

أثناء التخمير ، تتم مراقبة النمو من خلال عدد المستعمرات في وسطPCA بعد التخفيفات المتتالية ثم يتم قياس التخثر.

يتم إنتاج الإنزيم في نهاية المرحلة الأسية ويزداد مع المرحلة الثابتة.

الكلمات المفتاحية PCA :ا نزيم التخثر ، عصية الرقيقة ، نشاط التخثر ، نشاط تحلل البروتين ، التخمير.

Résumé

ABSTRACT:

The objective of Our Works consists initially in isolating micro-organismes from soil taken near a dairy located in BOUSKEN (Médéa) the medium used is PCA containing 10% sterile skimmed milk to which is added 2% amidaze.

The bacteria are cultured in a medium containing 05% of its wheat 0.3 of yeast extract 0.4% of glucose 0.2% of casein 0.3% Na2Hpo4 it is a medium which has been adopted in previous Works for the culture of *bacillus*

Incubation takes place at 30C° for 24 hours with shaking at 110rmper. Extraction of the enzyme is carried out after filtration of the medium on a cloth (filter paper).

The filter undergoes centrifugation at 4°C for 30 min.

After testing several strains we selected a *BACILLUS SUBTILIS* strain

The strain was selected for its very satisfactory coagulant activity.

We carried out two center composite type experiment plan for the first the composition of the production medium and 05% wheat bran 0.3% yeast extract 0.3% Na2hpo40.05 glucose 1.01 casein and a T 35° C. stirring is at 200 vpm. a second shot gave us: 7% wheat bran 0.094% casein 0.3% yeast extract 0.3% Na2hpo4 temperature is 40°C stirring is 150 vpm coagulant activity is 2.82up/l . the proteolytic activity is During fermentation, growth is monitored by the number of colonies in PCA medium after successive dilutions and then coagulant is measured.

The production of the enzyme takes place at the end of the exponential phase and increases with the stationary phase.

Key Word :

PCA ,coagulant enzyme, bacillus subtilis, coagulant activity, proteolytic activity,

Fermentation.

Sommaire

Introduction 1

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1. Présure 3

2 . Les composants de la présure 4

2.1 La chymosine 4

2.2 La pepsine 4

3. Obtention de la présure commerciale 5

4. Succédanés de présure 5

5. Autres enzymes coagulant le lait 6

5.1 Les enzymes coagulantes d'origine végétale 6

5.2 Les enzymes coagulantes d'origine animale 7

5.3 Les enzymes coagulantes d'origine microbienne 8

6.Les protéases ou peptidases 10

Définition 10

7. Classification Selon la nomenclature de l'Union internationale de Biochimie et Biologie moléculaire 11

7.1. Protéases à cystéine 11

7.2. Protéases à acide aspartique 11

7.3.Les Métalloprotéases 12

8. Applications alimentaires 12

8.1. Industrie laitière 12

9. Le genre Bacillus 13

9.1.Intérêt industriel 14

A. Le lait 15

A.1. Définition 15

A.2. La composition du lait 15

A.2.1. Eau 17

A.2.2. Matière grasse 18

A.2.3. Les protéines 18

A.2.4. Les caséines 18

A.2.5. Les glucides 19

A.2.6. Vitamines et les Enzymes 19

A2..7.Les minéraux du lait 20

A.3. Valeur nutritionnelle du lait 20

B.Le fromage 21

B.1. Définition 21

B.2Fromage frais 21

B.3. Composition du fromage frais 22

B.4. Transformation du lait en fromage 22

Chapitre 2

Matériels et méthodes

1- origines de la souche 25

I-1 Méthode d'isolement de la souche 26

II-1 Obtention de l'extrait coagulant de *Bacillus* 27

Revivication de la souche Bacilus Subtilius 27

II- 2- Préparation de l'inoculum 28

II-3 . Préparation et inoculation de milieu de culture 29

II-4 . Extraction de la protéase 30

II.5 Caractérisation de l'extrait enzymatique brut 31

II.5.1.Mesure des activités enzymatiques 31

II.5.1.1.Mesure de l'activité coagulante (AC) 31

II.5.2. Mesure de l'activité protéolytique 32

Table des Matières

3. Détermination de l'indice AC/AP 33

4. Détermination de la méthode température optimale de l'activité 33

5. Détermination de concentration optimale du Ca CL_2 34

Examen macroscopique 34

6. Le protocole de la coloration de gram Technique 35

7. Identification biochimique 36

7.1 Test de la coagulasse 36

8. Ensemencement des galeries 37

8.1 Préparation de la galerie 37

8.2 Préparation de l'inoculum 37

8.3. Inoculation de la galerie 38

8.4. LECTURE DE LA GALERIE 38

9.1. Détermination de profil numérique 39

9.2.1. Galerie miniaturisée API 20E 39

9.2.2. Galerie miniaturisée API 50 39

10. MATERIEL 41

10.2. Produit chimiques et réactifs 42

11. Essai de fabrication du fromage frais par l'utilisation de l'EEB 42

11.1. Étapes de fabrication du fromage 42

11.2. Préparation du lait 43

A . Pasteurisation 43

B Ensemencement du lait traité 43

C .Emprésurage 44

D. D'écaillage et délactosage 44

E. La cuisson du caillé 45

F. Pré pressage, moulage, pressage 45

I. Le salage 46

12 Résumé des étapes de fabrication du fromage frais..... 47

13. Analyses physico-chimique du fromage 48

A. Le pH 48

B. Détermination de l'acidité..... 48

C. Détermination de la teneur en matière grasse..... 49

D. Détermination de l'extrait sec total 49

E Détermination de l'extrait sec dégraissé (ESD)..... 50

F. Détermination du rendement fromager..... 50

14. analyse microbiologique du fromage 50

A. Objectif 50

B. L'échantillonnage 50

C. Préparation des dilutions décimales 51

D. Les germes recherchés pour cette denrée et leurs dénombrements..... 51

Chapitre 3

Résultats et discussion

1* Identification de la souche 54

2* Observations macroscopique et microscopique..... 54

3* Caractérisation de l extrait Enzymatique brut 58

4* Activités coagulante de l EEB..... 58

5. Essai de fabrication d'un fromage frais 64

A. Analyses physicochimiques du fromage..... 64

A 1 Acidité et matière grasse :..... 65

6 Rendement de fromager 66

7 Analyses microbiologiques 67

A. Préparation de la dilution mère 67

B * Préparation des dilutions décimales..... 67

C* Dénombrement des germes 68

Table des Matières

Conclusion 71

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Composition moyenne du lait entier **(FREDOT, 2006).**

Tableau 02 : Indique les proportions des différents minéraux du lait.

Tableau 03 : Illustre la composition moyenne d'un fromage frais pour 100g **(Eck and Gillis, 2006).**

Tableau 04 : Absorbance des différents MC Farland standard à 600 nm.

Tableau 05 : Représente la coagulation de lait dans différents temps .

Tableau 06 : Les réactifs et produit chimiques **.**

Tableau 07 : Bactérie possèdent une enzyme coagulante**.**

Tableau 08 : présente activités et la force de notre souche.

Tableau 09 : comparaison de AC de l'EBB aux autres AC des coagulases.

Tableau 10 : composition physicochimiques du lait utilisé dans la fabrication du fromage.

Tableau 11 : indique les résultas des analyses physicocimiques des deux fromages fabriqués .

Tableau12 : Résultats physicochimique des analyses du fromage.

Liste des Figures

Figure01 : Observation microscopique de ***BACILLUS SUBTILIS*** après la coloration de gram

Figure02 : Représente un globule gras du lait

Figure 03 : Représente un globule de caséine du lait

Figure 04 : Prélèvement du sol

Figure 05 : La souche de ***Bacillus Subtilisis***

Figure 06: Préparation de l'inoculum

Figure07 : Inoculum avant la filtration

Figure 08 : L'obtention de l'extrait enzymatique brut

Figure 09 : Schéma représentant les étapes d'obtention d'EEB.

Figure 10 : Observation macroscopique de genre de bactérie ***BACILLUS SUBTILISIS***

Figure 11 : Observation microscopique de *Bacillus Subtilisis* **(original ,2022)**

Figure12 : Teste coagulasse

Figure 13 : L'ajoute de la suspension bactérienne

Figure14: La lecture de la résultat de galerie API 20

Figure 15 : Représente un galerie API 50

Figure 16 : La pasteurisation du lait.

Figure 17 : L'ajout de présure avec une micropipette.

Figure 18 : Egouttage.

Figure 19 : préparation pour la filtration

Figure 20 : Le salage.

Figure 21 : le moulage

Liste des Figures

Figure 22 : Présente la souche de Bacillus Subtilis sous microscope(original, 2022)

Figure 23 : Présente Test de catalase positive+ .

Figure 24 : Lecture de la galerie API 50.

Figure 25 : lecture à 24h et 48h de la galerie API 50CH pour la souche Bacillus Subtilis.

Figure 26 : Présente l'extrait Enzymatique brut.

Figure 27 : EKOMILK pour les analyses physico-chimiques.

Figure 28 : Détermination du PH du lait.

Liste des abréviations

AC : Activité coagulante.
AP : Activité protéolytique.
ANP : Azote non protéique.
AP : Azote protéique.
AFNOR : Association Française de Normalisation.
CMP : caséino macro peptide.
DO : densité optique.
D° : Degré Dornic.
ESD : extrait sec dégraissé.
EST : extrait sec totale.
EPT : Eau Peptonée Tamponné.
EEB : extrait enzymatique brute.
ECD2 : extrait coagulant gastrique de dromadaire âgé de 2 ans.
FEEB: Fromage fait à base d'extrait enzymatique brute.
FP : Fromage fait à base de la présure.
FIL : Fédération Internationale du Lait.
FAO : Food and alimentation organisation.
GNP : glycomacropeptide.
MG : matière grasse.
MS : Moyenne des scores.
PHi : point isoélectrique.
PM : poids moléculaire.
Rdt : rendement fromage
TCA : Acide trichloracétique.
UP : Unité présure.
US : Unité Soxhlet.

Introduction

Introduction

La première étape de la transformation du lait en fromage nécessite traditionnellement l'emploi d'un agent coagulant, appelé présure.

La coagulation joue un rôle déterminant dans la technologie fromagère. Elle est réalisée en vue d'exploiter une propriété particulière des gels lactés qui est de s'égoutter spontanément. Cette évolution se traduit par la séparation progressive de la majorité de l'eau constitutive du lait sous forme de lactosérum et d'un substrat semi-solide ou caillé primitif.

Le lait coagulé constitue le début de la fabrication du fromage. Au final, l'action conjuguée et variable d'enzymes et de microorganismes (affinage ou maturation) permettront l'obtention d'un produit aux saveurs spécifiques, Ce dernier peut être caractérise comme la conversion d'un aliment périssable à grande teneur d'humidité (le lait) en un aliment compact de longue conservation et de haute valeur nutritive. Il occupe une place de choix comme aliment de bonne conservation, riche en protéines, matière grasse, calcium, phosphore et autres éléments nutritifs (DAVIS,1976) .Ainsi, les fromages sont par excellence des aliments hautement digestibles, capables de satisfaire le besoin nutritionnel élémentaire et intéressants pour tous les groupes d âges.

Le processus de coagulation est provoqué par l'action d'un coagulant ajouté à un taux bien défini au lait de fabrication, lui-même utilisé à une température et un pH précis. Le coagulant traditionnel de l'industrie laitière est la présure ; elle est extraite de l'estomac du jeune veau Concernant les agents coagulants, la quantité de présure disponible est devenue insuffisante du fait de l'augmentation de la production mondiale de fromage :le besoin de coagulants de remplacement s'est fait sentir dès le début des années 1960.De nombreux substituts d'origine variable (animale, végétale, ou microbienne) ont été proposés. (Ernesrom, 1997**).**

Cependant, les recherches continuent dans le but de trouver des enzymes de remplacement de la présure. Depuis une quarantaine d'années, les industries de fermentations se sont considérablement développées dans le monde et produisent des molécules variées dont un grand nombre d'enzymes.

En particulier, un travail considérable a été réalisé dans la sélection de microorganisme capables de produire des enzymes coagulantes.

Introduction

L'objectif de notre travail est donc d'isoler à partir du sol algérien, une souche microbienne capable de fournir une protéase de bonne activité coagulante et de activité protéolytique, d'optimiser les conditions de production par le choix d'un milieu de culture L'ensemble de ce travail est reparti en plusieurs volets :

La première partie comporte une synthèse bibliographique traitant des protéases en général et le présure. le lait d'enzymes coagulantes en particulier, de la fabrication du fromage, des microorganismes impliqués, du processus de fermentation et des plans d'expériences.

Une deuxième partie consacrée aux méthodes employées afin d'atteindre les objectifs de production d'enzymes, extraction, , et un essai de fabrication de fromage), Une autre partie comporte les résultats seront présentés discuter dans un nouveau chapitre .

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

1. Présure

La coagulation enzymatique du lait est une étape cruciale dans le processus de la Fabrication du fromage. La présure est un mélange d'enzymes protéolytiques et lipolytiques Comme la chymosine, la pepsine et la lipase. Son activité est requise pour la coagulation Enzymatique du lait. La présure est responsable de la dégradation des caséines par rupture des liaisons peptidiques covalentes de la K-caséine formée entre la phénylalanine et la méthionine**(Selin et al., 2018).** Le clivage enzymatique provoque la déstabilisation des micelles de la caséine qui sont agrégées et une matrice protéique tridimensionnelle est obtenue formant le

caillé **(Fox et al, 2016 ; Amira et al., 2017).** La protéolyse a pour rôle principale d'être responsable de la formation de caillé. De plus, elle

est liée à la libération d'acides aminés précurseurs de réactions cataboliques dans lesquelles des composés aromatiques sont produits **(Katsiari et al, 2000 ; Hayaloglu & Karabulut, 2013 ; Fox et al., 2016).**

Dans la fabrication du fromage, la coagulation du lait est traditionnellement réalisée par la chymosine de la présure de veau obtenue à partir de l'abomasum des animaux allaités. La présure extraite d'abomasus de veau, de chevreau ou d'agneau étaient la principale source animale commerciale. D'autres enzymes sont capables d'initier la protéolyse, comme les protéinases aspartiques. Ils peuvent être extraits de certaines plantes, de microorganismes et de différents ruminants tels que l'agneau et la chèvre **(Balabanova et al., 2017; Selin et al. 2018).** Actuellement, plus de 90% de la présure utilisée dans la fabrication fromagère, est une chymosine produite par fermentation. Les propriétés rhéologiques et sensorielles du fromage sont liées à l'activité enzymatique **(Amira et al., 2017).** Les substituts de présure doivent avoir une activité protéolytique relativement faible afin de maintenir la qualité du produit car une protéolyse excessive peut entraîner une perte de rendement pendant la fabrication fromagère dues à la dénaturation de la κ-caséine dans le lactosérum et le développement du goût amer dans le produit final **(Fox et al., 2016).**

Pour cette raison, la chymosine est particulièrement adaptée à la fabrication du fromage en raison de sa faible activité protéolytique et sa forte activité de coagulation du lait. Les substituts les plus importants qui répondent aux exigences de la fabrication du fromage sont ceux d'origine microbienne, végétale et les enzymes recombinantes **(Shah et Mir, 2014).**

En effet, quatre sources de présure sont actuellement disponibles sur le marché: présure de veau, chymosine recombinante, présure végétale ou présure microbienne.

Selon **García-Gómez et al. (2019),** il n'existe aucune étude comparant l'effet des quatre présures sur le même type de fromage .

2 . Les composants de la présure

2.1 La chymosine

La chymosine est la protéase majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale **(Ramet, 1997).** Elle est synthétisée sous forme de prochymosine, activée sous l'action du suc gastrique. Elle subit alors une conversion en chymosine active. La chymosine est une holoprotéine, de poids moléculaire voisin de 30 kDa **(Scriban, 1993).** Elle est stable entre pH 5 et 6 ; son activité est optimale à pH voisin de 5 ; elle est inactivée à pH 7,5 et est dénaturée à pH 8. Sa température optimale d'action est voisine de 40°C. L'inactivation thermique a lieu dès 50°C, elle est totale à 61°C **(Lenoir et al, 1985 ; Scriban, 1993).** Production de la chymosine fermentaire

- Grâce au développement du génie génétique, il est actuellement possible de produire de la chymosine à partir de micro-organismes **(Alais et Linden., 1997 ; Collin et al., 1997 ; Rao et al., 1998 ; Beldarrain et al., 2000 ; Munoz et al., 2004)**. La chymosine fermentaire résulte du clonage du gène responsable de la production de la chymosine à partir de l'estomac de veau sur certains micro-organismes. Les plus utilisés sont : Escherichia coli, Kluyveromyces et Aspergillus. 2

Cette méthode constitue l'une des voies porteuses d'espoir pour la synthèse d'enzymes utilisables dans l'industrie laitière.

2.2 La pepsine

La pepsine est le constituant mineur de la présure dont la sécrétion gastrique ne devient prépondérante qu'après sevrage **(Ramet, 1997).** Elle est produite sous forme d'un précurseur inactif, le pepsinogène. Il passe par acidification sous la forme active : la pepsine de poids moléculaire 35 kDa **(Alais, 1984).** A l'opposé de la chymosine, la pepsine possède une activité protéolytique élevée et une faible activité coagulante. D'après (**Broome et Hickey, 1990),** 20% de l'activité coagulante est assurée par la pepsine dans la fabrication fromagère (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. C'est une enzyme thermosensible en solution après 55°C. Elle est dénaturée à des températures à 70°C **(Graiday, 1978).** Comme pour toutes les préparations enzymatiques, l'activité protéolytique de la présure est fortement influencée par les facteurs de milieux en particulier par le pH et par la température. L'activité la plus élevée se situe à pH 5,5 et à la température de 42◦C. De part et d'autre de ces valeurs, l'activité décroit rapidement ; elle devient nulle au voisinage de 0◦C et vers 65◦C.

En fromagerie, on règle l'action de la présure en ajustant les conditions de milieu à des valeurs plus ou moins éloignées de ces optimums et en fixant la concentration enzymatique. Ces paramètres sont particuliers à chaque famille de fromages **(Eck et Gillis ,1997)**

3. Obtention de la présure commerciale

Industriellement la présure est extraite par macération de morceaux de caillettes sèches de veaux non sevrés, dans une saumure à 10% NaCl contenant des additifs nécessaires à la préparation (telle que le phosphate disodique), à la conservation (les plus utilisés étant les antiseptiques et les antifongiques) et à la coloration (caramel). Le jus brut est ensuite purifié par diverses méthodes physico-chimiques. 2

Selon **Goursaud (1999),** il faut de 1 à 2 caillettes de 60 g pour obtenir 1L d'extrait commercial au 10000e . Ce dernier, après ajustement avec de la saumure, contient alors 10 à 16% de NaCl. Il est de couleur jaune d'or. Le mélange contient les deux enzymes : la chymosine et la pepsine bovine **(Goursaud, 1999).** III.1.5 Propriétés spécifiques exigées des succédanés de présure Les enzymes de remplacement de la présure doivent répondre aux critères suivants **(Ramet).**

Selon **Goursaud (1999),** il faut de 1 à 2 caillettes de 60 g pour obtenir 1L d'extrait commercial au 10000e . Ce dernier, après ajustement avec de la saumure, contient alors 10 à 16% de NaCl. Il est de couleur jaune d'or. Le mélange contient les deux enzymes : la chymosine et la pepsine bovine **(Goursaud, 1999)**

4. Succédanés de présure

L'utilisation de la présure animale traditionnelle est limitée pour des raisons religieuses ou alimentaires. De plus, l'extraction et la purification de la présure de veau comportent plusieurs étapes et opérations, ce qui rend l'approvisionnement en enzymes très laborieux et coûteux **(Puglisi et al., 2013).** En outre, en raison de l'expansion de la production fromagère mondiale, la recherche de substituts s'est intensifiée **(Merheb-Dini et al., 2010).**

A cette fin, différentes protéases d'origine microbienne **(Ahmed et al., 2016; Narwal et al., 2016 ; Zhang et al., 2019)** , végétale **(Mazorra-Manzano et al., 2013 ; Esposito et al., 2016; Shi et al., 2019)** et animale **(Kumar et al., 2006; Moschopoulou et al., 2006)** ont été utilisés.

5. Autres enzymes coagulant le lait

la présure ou ses substituts, sont des endopeptidases appartenant au groupe des aspartyl protéases. Ces enzymes ont une double activité : l'une très spécifique sur la caseine k, l'autre de protéolyse générale portant sur toutes les protéines, qui sont susceptibles de se manifester aux cours de l'affinage des fromages. La fabrication des fromages nécessite une phase de coagulation du lait qui permettra l'expulsion (synérèse) d'une plus ou moins grande partie de l'eau et de matière soluble(le sérum). On obtiendra ainsi un caillé ou fromage non affiné **(Lenoir et al., 1983 ; Brule et Lenoir, 1997).** De nombreuses protéases sont capables de provoquer la coagulation du lait, mais toutes ne sont pas pour autant aptes à la fabrication fromagère car elles ne présentent pas les propriétés biochimiques et technologiques requises **(Ramet, 1997).** Les inconvénients majeurs de l'utilisation des protéases de remplacement sont dans certains cas, la baisse du rendement fromager **(Amiot et al., 2002)**.

Les protéases, en plus de leur activité coagulante, interviennent dans l'affinage des fromages**. (Mahaut et al., 2003).** En industrie laitière, le caractère fluctuant de l'approvisionnement en présure a conduit à l'emploi de préparations enzymatiques d'origines diverses, coagulant le lait de façon analogue à la présure **(Guérard, 1987).**

Des préparations enzymatiques coagulant le lait dans lesquelles la chymosine est remplacée plus ou moins totalement par d'autres enzymes à mode d'action analogue. Dans cette optique, un certain nombre d'enzymes ont été caractérisées. Il s'agit toujours de protéases susceptibles d'attaquer les caséines du lait et plus particulièrement la caséine k, dont la rupture d'une liaison peptidique particulièrement labile, la liaison Phe105-Met106 provoque la coagulation du lait **(Swaisgood, 1982).** Ces enzymes appartiennent au groupe des pepsines. La pepsine bovine, qui est assez proche de la chymosine au plan de la structure primaire **(Foltmann, 1970),** est déjà présente dans la présure avec la chymosine.

5.1 Les enzymes coagulantes d'origine végétale

Contrairement à la présure qui est spécifique à la κ-caséine, les aspartyl-protéases des plantes peuvent hydrolyser les caséines α, β et κ, ce qui provoque, une amertume et des défauts de texture des fromages et qui limite leur utilisation industrielle. **(Simöes et Faro,**

2004). Plusieurs préparations coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures **(Ramet, 1997).** L'utilisation de la fleur de cardon comme agent coagulant a été considérée comme l'un des facteurs déterminants de la qualité des fromages typiques portugais au lait de brebis **(Agboola, 2002, Zhao et al., 2003)**

l'extrait coagulant du **Cynara cardunculus** a fait l'objet de nombreuses études **(Macedo et al., 1993 ;Martin et al., 1996 ; Vioque et al., 2001).** Cependant il a été conclu que cet agent coagulant se caractérise par une activité protéolytique excessive ce qui confère un goût amer au fromage.

D'autres végétaux fournissent des coagulasses telles que les ficines extraites du latex du figuier, la papaine du papayer, la bromelaine de l'ananas **(Sardinas, 1968**) etc… L'activité coagulante de ces préparations végétales est très variable car elle est fortement influencée par l'état de maturité de la plante et par les conditions de collecte et de stockage **(Lopez et al, 1996).** De ce fait, l'emploi de ces protéases coagulantes est toujours resté limité aux aires locales de production **(Eck, 1987).**

Généralement, les protéases végétales sont rarement utilisées en industrie fromagère en raison de leur activité protéolytique très élevée, qui se traduit par l'apparition d'un ensemble d'inconvénients technologiques tels que **(Alais, 1984)** : mauvaise fermeté des caillés obtenus, baisse du rendement fromager, apparition d'amertume. Ces difficultés sont liées au fait que ces préparations brutes renferment souvent des mélanges de plusieurs enzymes dont l'activité manque de spécificité sur la caséine k **(Ramet, 1997).** Malgré les inconvénients évoqués précédemment, des études récentes ont été réalisés par différents auteurs, qui approuvent quelques avantages aux protéases extraites des végétaux , Ces dernières, sont plus stables à la chaleur par rapport aux protéases d'origine microbienne et animale **(Morsli, 1996).**

5.2 Les enzymes coagulantes d'origine animale

Des substituts de présure sont produits par plusieurs mammifères comme le chameau **(Elagamy, 2000 ; Siboukeur, 2005),** le buffle **(Mohanty et al., 2003)…**et même par les viscères de poissons **(Guérard, 1987).** L'étude comparative des activités coagulantes et protéolytiques de ces enzymes a révélée qu'elles présentent des caractéristiques proches de celles de la présure (**Polaina et Mac Cabe, 2007).** De nombreuses protéases d'origine animale ont fait l'objet d'expérimentation en vue d'une utilisation potentielle en fromagerie .

Cependant toutes ne sont pas pour autant aptes à la fabrication fromagère ; seules les pepsines porcines et bovines présentent un intérêt industriel **(Eck, 1987).** Les pepsines ont une activité protéolytique assez voisine de celle de la chymosine ; leurs sensibilités aux variations des facteurs de milieu sont semblables sauf pour l'effet pH ; elles ont un caractère plus acide avec un optimum au voisinage de pH 1,5-2,0**(Ramet, 1997).** Certains succédanés d'origine animale peuvent être considérés comme des produits de remplacement acceptables de la présure de veau. Plusieurs pepsines de poissons, tels que celles issues de : sardine **(Noda et Murakami, 1981),** morue d'Atlantique **(Brewer et al, 1984)** et requin **(Nungaray et Legoffic, 1996)** ont été purifiées et partiellement caractérisées. Les chercheurs sont également arrivés à extraire la pepsine à partir de la muqueuse gastrique du phoque **Shamsuzzaman et Haard, 1985)** et de l'estomac du lapin **(Ramman, 1994)** L'obtention de la pepsine sous forme cristallisée à partir d'extraits de muqueuse gastrique bovine a été réalisée pour la première fois par Northrop en **1929(Moll et Moll, 1998).** La deuxième enzyme gastrique obtenue sous forme cristallisée été la pepsine porcine et cela par **Herriot en 1938 (Banga-Mboko et al., 2002).**

5.3 Les enzymes coagulantes d'origine microbienne

En pratique, l'utilisation des préparations enzymatiques microbiennes a été soumise à une stricte réglementation, imposant des contrôles hygiéniques (liés à leur production et extraction) et toxicologiques sévères, afin d'éviter tout risque de toxicité lié à la présence d'antibiotiques et/ou d'aflatoxines **(Noor-Devillietet al, 1983)**.On distingue deux catégories de protéases microbiennes : les succédanés d'origine bactérienne et les succédanés d'origine fongique.

D'origine bactérienne :

Depuis une quarantaine d'années, une puissante industrie de transformations s'est développée dans le monde. Elle produit des substances variées dont une grande partie d'enzymes qui trouvent de nombreuses applications dans des secteurs industriels variés et en particulier des protéases susceptibles de coaguler le lait. Ce sont surtout les souches du genre Bacillus : Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus polymixa et Bacillus coagulans, qui ont fait l'objet de plusieurs recherches pour la production de coagulasses. Leur utilisation demeure limitée par suite de réglementation stricte et leur prix de revient. D'autre part, leur aptitude à la coagulation est meilleure que celle d'origine végétale et moins bonne que celle des enzymes produites par les moisissures.

Les caillés

obtenus manquent de cohésion du fait d'une trop forte activité protéolytique par comparaison à la présure animale **(Alais , 1984).** Selon **Puhan et Irivine (1973 a et b)** , des fabrications de fromages type cheddar canadien avec la coagulase de **Bacillus subtilis,** en comparaison avec un fromage témoin fait avec la présure traditionnelle, présentaient des différences notables de point de vue rendement fromager et qualité organoleptique due à un degré excessif de protéolyse, corrigé par acidification du lait préalablement à l'addition de l'enzyme au lait. Un travail considérable a été réalisé dans la sélection de microorganismes capables de produire des enzymes coagulantes. Plusieurs raisons sont à l'origine de cet intérêt. Les enzymes microbiennes peuvent être produites en quantité pratiquement illimitée sans qu'il y ait dépendance d'un approvisionnement en matière première. Le microorganisme utile est cultivé sur un milieu spécifique de composition optimisée. Son cycle de développement, limité à quelques heures ou quelques jours, est rapide comparativement à celui nécessaire à la génération d'un animal ou d'une plante. A la fin du cycle de développement du microorganisme, les enzymes sont extraites et purifiées selon des techniques bien élaborées qui garantissent une composition constante.

On préfère sélectionner des microorganismes producteurs d'enzymes exo cellulaires plus faciles à isoler du milieu de culture que les enzymes endocellulaires qui impliquent de réaliser une rupture préalable des structures bactériennes pour libérer le composé actif. En Algérie, **(Matoub, 2000)** a mis en évidence la possibilité d'obtenir une coagulasse à partir d'une souche locale de **Bacillus subtilis** sélectionnée (Lc33), mais leur utilisation mentation stricte.

D'origine fongique

:• Actuellement, c'est sur les protéases d'origine fongique que l'on fonde le plus d'espoir. Contrairement aux protéases bactériennes, les protéases fongiques ont donné des résultats meilleurs, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure **(Luquet ,1985).** Par ailleurs, certains auteurs **(Green et Stackpoole, 1975 et Jarmulet al., 1982)** ont démontré l'efficacité d'utiliser une préparation fongique "Noury ou fromase"en mélangeavec la pepsine dans la fabrication de fromage.

Plusieurs préparations sont déjà commercialisées sur le marché international et utilisées à plus ou moins grande échelle selon les pays (Tab. , elles proviennent de trois espèces de moisissures **(Alais ,1984 ; Green et Stackpoole , 1975 ; Berankovaet al., 1987) :**

-Endothiaparasitica :

Moisissure parasite du châtaignier de laquelle, la firme américaine "PFIZER" a extrait une préparation coagulante en poudre commercialisée sous le nom de "sure-curd" et "suparen". -Mucor pusillusLindt : moisissure banale mésophile du sol, de laquelle la firme japonaise "MEITO-SANG YO" a extrait une préparation commercialisée par " NOURY". -**Mucor miehei :**

moisissure banale thermophile du sol dont quatre préparations enzymatiques différentes sont exploitées **(Awad et al., 1999).**Il s'agit de : Rennilase commercialisée par la firme danoise « NOVO »

.• Fromase : commercialisée par la firme française « RAPIDASE »

.• Marzyme commercialisée par la firme américaine « MARSHALL »

.• Hannilase commercialisée par la firme danoise « HANSEN »

• Ces préparations enzymatiques, ont été soumises à des contrôles hygiéniques et toxicologiques sévères, afin de démontrer l'absence d'antibiotiques et d'aflatoxines **(NoorDevilliet et al., 1983).** Ainsi, il ressort d'après plusieurs recherches que les préparations issues de **Mucor miehei**, sont celles qui se rapprochent le plus de la présure animale **(Alais et Lagrange, 1972). Cité par Scriban (1993),** il confirme qu'il est parfaitement possible grâce à l'utilisation d'enzyme extraite de **Mucor miehei** (solution Rennilase), de fabriquer des fromages d'excellentes qualités en leur adoptant les processus technologiques requis. Parmi les substituants de la chymosine,les enzymes de Mucor pusillus et de **M. miehei** ont connu le plus large développement. De par ses propriétés, la protéase de **M. miehei** se rapproche le plus de la présure animale, notamment pour ce qui concerne le ratio activité coagulante/ activité protéolytique **(Joyeaux, 1982).** De plus, les enzymes fongiques se caractérisent par une stabilité thermique analogue à celle de la présure **(Goursaud, 1993).**

6.Les protéases ou peptidases :

Définition

Sont des enzymes protéolytiques qui catalysent l´hydrolyse de liaisons peptidiques. Dans certains cas, les enzymes sont hautement spécifiques et hydrolysent une unique liaison peptidique d´une protéine donnée. Dans d´autres cas, les peptidases hydrolysent plusieurs

liaisons peptidiques qui présentent une séquence ou conformation déterminée **(Hartely, 1960).**

Les protéases sont nombreuses, représentant environ 2% de tous les produits géniques **(Rawlings et Barrett, 1994)** et environ 10% des enzymes réunies dans la liste « EC ». Les protéases sont la seule classe d'enzyme qui occupe une position centrale par rapport à leur application dans les domaines physiologique et commercial. Les progrès des techniques analytiques ont démontré que les protéases induisent des modifications hautement spécifiques et sélectives des protéines : comme l'activation de la forme zymogène par protéolyse, la lyse des caillots des fibrines (coagulation du sang), la transformation et le transport des protéines secrétées à travers les membranes **(Rao et al., 1998)**

7. Classification Selon la nomenclature de l'Union internationale de Biochimie et Biologie moléculaire

les protéases sont classées dans le sous-groupe 4 du groupe 3 des hydrolases. Cependant elles ne se soumettent pas facilement à ce système de classification à cause de la complexité de leur structure et leurs mécanismes d'action. Récemment, les protéases sont classées sur la base de trois critères majeurs : le type de réaction à catalyser, la nature chimique du site catalytique et l'évolution du site de référence.

Les protéases à serine sont inhibées irréversiblement par le diisopropylfluor phosphate (DFP).

7.1. Protéases à cystéine

sont présentes chez les microorganismes, les plantes et les animaux. Leur activité dépend du site catalytique qui est composé de cystéine et d'histidine dont l'ordre diffère entre les familles. Elles sont généralement actives seulement en présence d'agents réducteurs comme le cyanure et la cystéine. Selon la spécificité de leurs chaines, les protéases à cystéines sont divisées en : papaïne, trypsine, acide glutamique spécifique et autres **(Barrett, 1994).** La majorité des protéases à cystéine présente un pH optimum à la neutralité et peu d'entre elles sont actives à pH acide. Elles sont sensibles aux agents sulfidryl, mais ne sont pas affectées par le DFP, et le chélateur métallique **(Rao et al., 1998)**

7.2. Protéases à acide aspartique

Elles sont communément connues comme des protéases acides, ce sont des endopeptidases qui dépendent de la présence d'un résidu aspartyl pour leurs activités

catalytiques. Les protéases acides sont regroupées en trois familles nommées : pepsine, rétropepsine et les enzymes de rétrovirus **(Hartley, 1960; Barrett, 1995).**

La majorité des protéases à acide aspartique montre une activité maximale à faible pH (3 à 4) avec un pH isoélectrique dans l'intervalle est de 3 à 4,5. Leurs masses moléculaires varient de 30 à 45 kDa. Les protéases à acide aspartique sont inhibées par la pepstatine. La protéase à aspartyl d'origine microbienne peut être divisée en deux groupes : La pepsine comme les enzyme produite par Aspergillus, Penicillium, Rhizopus et Neurospora **(Kumar et al., 2005).** La rénine comme les enzymes produites par Endothia et Mucor sp **(Sardinas, 1968 ; Escobar et Barnett, 1993).**

7.3.Les Métalloprotéases :

Elles sont le groupe le plus diversifié. Il se caractérise par la présence d'ions métalliques divalents (généralement le zinc) dont le rôle est important pour leurs activités. Elles incluent des enzymes de différentes origines dont les plus importantes sont : les collagénases des organismes supérieurs, les toxines hémorragiques du venin de serpent et la thermolysine **(Barrett et al., 1995).**

Ce nouveau type catalytique n´a été découvert que très récemment grâce aux recherches effectuées sur les protéasomes. Un protéasome est, en effet, un complexe de protéases impliqué dans la dégradation protéique. Il est d´une grande importance pour la croissance et la viabilité de la cellule en raison de ses fonctions dans le cycle mitotique et dans le contrôle de la demi-vie de la plupart des protéines cellulaires. La recherche chez les procaryotes de particules ressemblant aux protéasomes eucaryote a conduit à la découverte d´un complexe protéolytique chez Thermoplasma acidophilum.

8. Applications alimentaires

8.1. Industrie laitière

L'application principale des protéases dans l'industrie laitière est la préparation du fromage. Les enzymes coagulant le lait sont classées dans trois principaux groupes : la présure animale, les coagulants d'origine microbienne et la chymosine génétiquement modifiée. Les deux premiers groupes proviennent de la classe des protéases acide à aspartique dont le poids moléculaire varie de 30 à 45 kDa **(Foltman, 1971; Fox, 1995).** Des recherches intensives dans ce domaine visent à produire des enzymes qui sont complètement inactivées à la

température de pasteurisation et contenant un faible taux de protéases non spécifiques. Les protéases produites **: GRAS (Generally Recognized As Safe)** par **Mucor miehei**, Bacillus subtilis et Endothia parasitica, remplacent graduellement la chymosine dans la production de fromage **(Sardinas, 1968 ; Fernandez-Lahore et al., 1998; Escobar et Barnett, 1993 ; Shieh et al., 2009).**

Industrie de panification La farine de blé est le composant principal dans l'industrie de panification. Il contient des protéines insolubles appelées gluten qui détermine les propriétés du pain. Les endos et les exopeptidases d'Aspergillus oryzae sontutilisées pour modifier par protéolyse, le gluten de la farine du blé **(Bourgeois et al., 1989).** Le traitement enzymatique du pain par les protéases améliore son extensibilité, réduit le temps

9. Le genre Bacillus

Le genre Bacillus englobe des bactéries à Gram positif en forme de bâtonnets droits, généralement mobiles grâce à des cils péritriches, capables de former des endospores, aérobies ou anaérobies facultatives. Les cultures âgées peuvent apparaitre gram négatif.
Les Bacillus sont très répandus dans la nature surtout dans le sol ; ils font partie de la flore banale contaminant de nombreux produits alimentaires et sont souvent protéolytiques.
Le genre de Bacillus est classiquement subdivisé en fonction de la morphologie et de la position de la spore en trois groupes :

Le groupe I : ce groupe est constitué des bacilles à Gram positif, présentant une spore centrale ou terminale, sphérique ou ovoïde, ne déformant pas la cellule. Ce groupe est divisé en 2 sous-groupes : le groupe IA constitué des bacilles d'un diamètre supérieur à 1 mm et contenant des inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate (Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides, Bacillus thuringensis) ;et le groupe IB rassemblant des bacilles d'un diamètre inférieur à 1 mm et dépourvus d'inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate (Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus...).

Le groupe II : ce groupe est constitué des espèces à Gram variable, présentant une spore ovoïde, centrale ou terminale, déformante (Bacillus circulans,Bacillusstearothermophilus)

Le groupe III : ce groupe est caractérisé par des bacilles à Gram variable et présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou sub-terminale (Bacillus globisporus, Bacillus insolitus,)

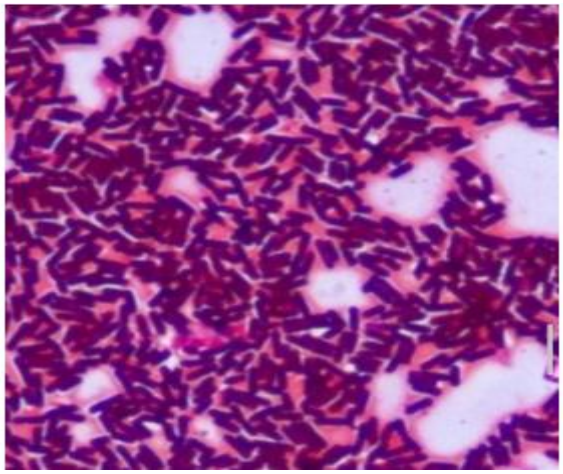


Figure01 : observation microscopique de *BACILLUS SUBTULISIS* après la coloration de gram

9.1.Intérêt industriel

Le développement considérable qu'a connu le genre Bacillus dans le domaine de la production d'enzymes industrielles, revient aux caractéristiques intéressantes que présente ce groupe :

Ces micro-organismes se cultivent facilement et s'adaptent parfaitement à un développement industriel,

Ils présentent un fort potentiel génétique : les différentes espèces se rencontrent dans des habitats variés et présentent de nombreux types trophiques (psychrophiles, mésophiles, thermophiles, neutrophiles, acidophiles, alcanophiles).

Ils excrètent à l'extérieur des cellules une quantité importante de leurs protéines enzymatiques.

Enfin, ces enzymes exocellulaires sont des hydrolases, famille qui a connu le

plus large développement pour les applications industrielles, notamment les amylases et les protéases **(Schiff, 1992)**

A. Le lait

A.1. Définition

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et nom surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir du colostrum » **(POUGHEON et GOURSAUD, 2001).**

Selon **ABOUTAYEB (2009),** le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré, sécrété par les glandes mammaires de la femme et par celles des mammifères femelles pour la nutrition des jeunes. Le lait cru est un lait qui n'a subi aucun traitement de conservation sauf la réfrigération à la ferme. La date limite de vente correspond au lendemain du jour de la traite.

Le lait cru doit être porté à l'ébullition avant consommation (car il contient des germes pathogènes). Il doit être conservé au réfrigérateur et consommé dans les 24h **(FREDOT, 2006).**

doit être en outre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présenter toutes les garanties sanitaires. Il peut être commercialisé en l'état mais le plus souvent après avoir subi des traitements de standardisation lipidique et d'épuration microbienne pour limiter les risques hygiéniques et assurer une plus longue conservation .

A.2. La composition du lait

FRANWORTH et MAINVILLE (2010) évoquent que le lait est reconnu depuis longtemps comme étant un bon aliment pour la santé. Source de calcium et de protéines, il peut être ajouté à notre régime sous plusieurs formes.

Les laits sont les seuls aliments naturels complets qui existent, chacun d'eux étant adapté à la race qu'il permet de développer **(MITTAINE, 1980).**

Selon **FAVIER (1985),** le lait est une source importante de protéines de très bonne qualité, riches en acides aminés essentiels, tout particulièrement en lysine qui est par

excellence l'acide aminé de la croissance. Ses lipides, caractérisés par rapport aux autres corps gras alimentaires par une forte proportion d'acides gras à chaîne courte, sont beaucoup plus riches en acides gras saturés qu'en acides gras insaturés. Ils véhiculent par ailleurs des quantités appréciables de cholestérol et de vitamine A ainsi que de faibles quantités de vitamine D et E.

Les principaux constituants du lait par ordre croissant selon **POUGHEON et GOURSAUD (2001)** sont:

- L'eau, très majoritaire ;
- Les glucides principalement représentés par le lactose ;
- Les lipides, essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras ;
- Les sels minéraux à l'état ionique et moléculaire ;
- Les protéines, caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles ;
- Les éléments à l'état de trace mais au rôle biologique important, enzymes, vitamines et oligoéléments ;

La composition moyenne du lait entier est représentée dans le tableau I. **FREDOT (2006)** rappelle que le lait est constitué de quatre phases :

- ✓ Une émulsion de matières grasses ou phase grasse constituée de globules gras et de vitamines liposolubles (A, D) ;
- ✓ Une phase colloïdale qui est une suspension de caséines sous forme de micelle ;
- ✓ Une phase aqueuse qui contient les constituants solubles du lait (protéines solubles, lactose, vitamines B et C, sels minéraux, azote non protéique) ;
- ✓ Une phase gazeuse composée d'O2, d'azote et de CO2 dissous qui représentent environ 5 % du volume du lait.

Tableau 01 : Composition moyenne du lait entier **(FREDOT, 2006).**

Composants	**Teneurs (g/100g)**
Eau	89,5
Matières azotés	3,44
Protéines	3,27
Caséine	2,71
Protéines solubles	0,56
Azote non protéique	0,17
Matières grasses	3,5
Lipides neutres	3,4
Lipides complexes	<0,05
Composés liposolubles	<0,05
Glucides	4,8
Lactose	4,7
Gaz dissous	5% du volume du lait
Extrait sec total	12,8g

A.2.1. Eau

D'après **AMIOT et al., (2002),** l'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion. La présence d'un dipôle et de doublets d'électrons libres lui confère un caractère polaire. Ce caractère polaire lui permet de former une solution vraie avec les substances polaires telles que les glucides, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles du sérum. Puisque les matières grasses possèdent un caractère non polaire (ou hydrophobe), elles ne peuvent se dissoudre et former une émulsion du type huile dans l'eau. Il en est de même pour les micelles de caséines qui vont former une suspension colloïdale puisqu'elles sont solides.

A.2.2. Matière grasse

JEANTET et al., (2007) rapportent que la matière grasse est présente dans le lait sous forme de globules gras de diamètre de 0,1 à 10µm et est essentiellement constitué de triglycérides (98%). La matière grasse du lait de vache représente à elle seule la moitié de l'apport énergétique du lait. Elle est constituée de 65% d'acides gras saturés et de 35% d'acides gras insaturés. Elle renferme:

- ✓ une très grande variété d'acides gras (150 différents) ;
- ✓ une proportion élevée d'acides gras à chaînes courtes,
- ✓ assimilés plus rapidement que les acides gras à longues chaînes ;
- ✓ une teneur élevée en acide oléique (C18 :1) et palmitique (C16 :0) ;
- ✓ une teneur moyenne en acide stéarique (C18 :0).

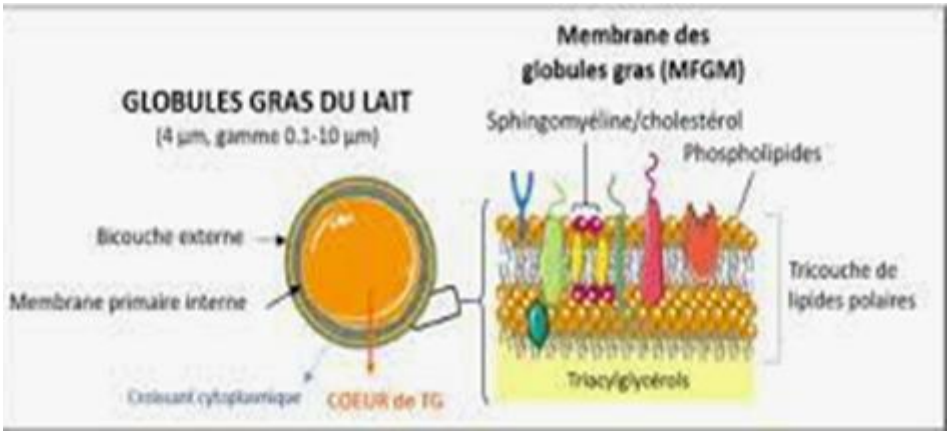


Figure 02 : représente un globule gras du lait

A.2.3. Les protéines

sous l'action de la présure ou lors de l'acidification à pH d'environ 4,6 –L .Elles constituent une partie importante du lait et des produits laitiers On les classe en deux catégories, d'après leur solubilité dans l'eau.

A.2.4. Les caséines

forment prés de 80% (α-S1, α- S2, β, κ) qui se regroupent sous forme de micelles précipitent es protéines de sérum, qui représentent environ 20% des protéines totales, se

trouve sous forme de solution colloïdale. Les deux principales sont la β-lactoglobuline et l'αlactalbumine. **(Amiot et al., 2002).**

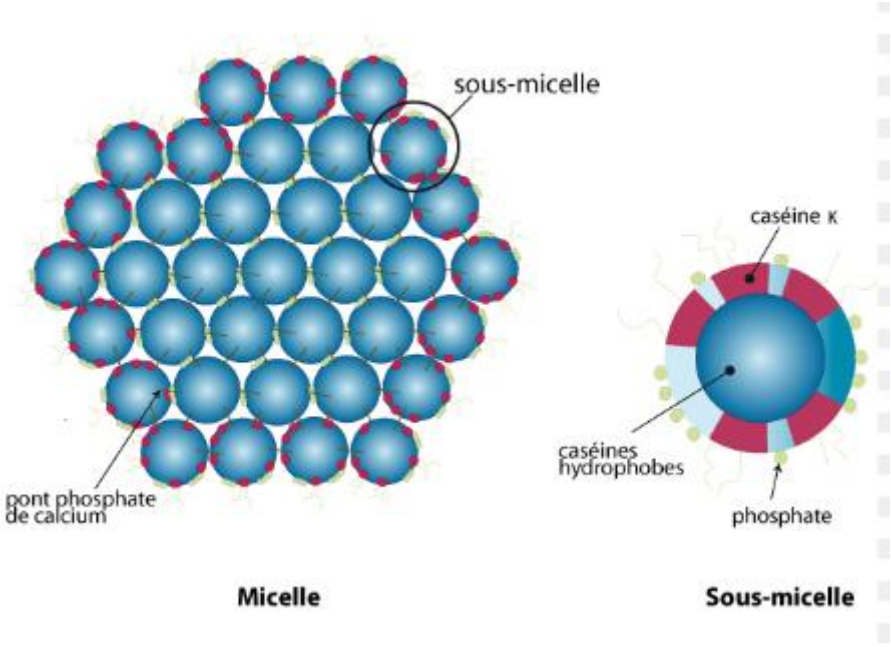


Figure 03 : représente un globule de caséine du lait

A.2.5. Les glucides :

Le lactose est le glucide le plus important du lait. D'autres glucides peuvent provenir de l'hydrolyse du lactose (glucose, galactose). Certains glucides peuvent se combiner et d'autres peuvent rester libre **(Amiot et al., 2002).** Comparativement au lait de vache (50 g/l), le lait de chèvre est moins riche en lactose, avec une variation allant de 44 à 47 g/l **(veinoglou et al., 1982 ; Roudj et al., 2005) .**

A.2.6. Vitamines et les Enzymes:

Selon **Vignola (2002),** les vitamines sont des substances biologiquement indispensables à la vie puisqu'elles participent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires. Le lait de chèvre se distingue par l'absence de β-carotène. Le lait contient principalement trois groups d'enzymes : les hydrolases, les déshydrogénases (ou oxydases) et les oxygénases **(Amiot et al., 2002).**

A2.7.Les minéraux du lait:

La quantité des minéraux contenus dans le lait après incinération varie de 0,60 à 0,90%. Ils prennent plusieurs formes ; ce sont le plus souvent des sels, des bases, des acides **(JUILLARD et RICHARD., 1996).** À cette liste s'ajoutent certains éléments, comme le soufre présent dans les protéines et les oligo-éléments suivants, qui sont présents à de faibles concentrations ou à l'état de trace : manganèse, bore, fluor, silicium, brome, molybdène, cobalt, baryum, titane, lithium et probablement certains autres. Cette composition est sujette à d'importantes variations selon les saisons et l'alimentation des vaches. Ainsi, un lait provenant de vaches en pâturage sera plus stable lors des traitements thermiques puisque sa teneur en citrate sera plus élevée ; ce composé fixe le calcium qui peut avoir un effet déstabilisant. Il est important de noter que la composition en minéraux d'un lait mammiteux tendra à se rapprocher de la composition du sang ; c'est pourquoi il sera plus riche en chlorures et en sodium, mais moins riche en calcium, magnésium, potassium et phosphore **(JUILLARD et RICHARD. 1996).**

Tableau 02 : Indique les proportions des différents minéraux du lait

Minéraux	**Teneur (mg/kg)**	**Minéraux**	**Teneur (mg /kg)**
Sodium(Na)	**445**	**Calcium(ca)**	**1180**
Magnésium(Mg)	**105**	**Fer(Fe)**	**0 .50**
Phosphore(P)	**896**	**Cuivre(Cu)**	**0.10**
Chlore(Cl)	**958**	**Zinc(Zn)**	**3.80**
Potassium(K)	**1500**	**Iode(I)**	**0.28**

A.3. Valeur nutritionnelle du lait

Le lait et les produits laitiers constituent un des quatre grands groupes reconnus d'une alimentation saine. Ces recommandations reposent surtout sur le fait que le lait et les produits laitiers constituent une bonne et même une excellente source de certains nutriments qui se retrouvent en concentration élevée dans ces aliments. Ce sont donc ces nutriments qui ont une signification particulière pour la santé, autant en ce qui concerne la croissance normale des

enfants que le maintien en santé et la prévention des maladies à tout âge de la vie. Par ailleurs, les concentrations ou l'intégrité de ces mêmes nutriments peut subir des modifications à la suite des différents traitements industriels appliqués au lait **(AMIOT et al., 2002).**

B.Le fromage

B.1. Définition

Le terme fromage dérive de l'ancien Français formage, issu du latin formaticum qui signifie "ce qui est fait dans une forme". On retrouve la trace de cette origine dans le mot fourme, appellation linguistique régionale courante et reprise par les appellations commerciales de certaines spécialités fromagères. À noter également le latin forma qui désigne un moule à fromage ;(le dictionnaire le robert).

B.2Fromage frais

Selon la norme du Codex alimentaires (**norme CODEX STAN 221 – 2001** pour les fromages non affinés y compris les fromages frais) et la norme internationale **FAO/OMS A-6(1978, modifiée en 1990),** le fromage frais ou non affiné est un fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après fabrication. Aux termes de la réglementation française (décret du 30 décembre 1988, ayant abrogé et remplacé le décret du 26 octobre 1953), la dénomination « fromage » est réservée à un produit fermenté ou non, obtenu par coagulation du lait, de la crème ou de leur mélange, suivie d'égouttage. Tous les fromages frais ont une DLC de 24 jours. Les fromages frais sont traditionnellement des fromages à égouttage lent, fabriqués à partir de laits ou de crèmes propres à la consommation humaine **(Boutonnier and Dunant, 1990).** Ils résultent de la coagulation à prédominance lactique du lait, combinant souvent l'action des ferments lactiques et celle de la présure. Ces fromages se caractérisent par l'absence d'affinage après les étapes d'égouttage et de moulage **(Corrieu and Luquet, 2005)**age frais Selon la norme du **Codex alimentarius (norme CODEX STAN 221 – 2001** pour les fromages non affinés y compris les fromages frais) et la norme internationale **FAO/OMS A-6 (1978, modifiée en 1990),** le fromage frais ou non affiné est un fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après fabrication. Aux termes de la réglementation française (décret du 30 décembre 1988, ayant abrogé et remplacé le décret du 26 octobre 1953), la dénomination « fromage » est réservée à un produit fermenté ou non, obtenu par coagulation du lait, de la crème ou de leur mélange, suivie d'égouttage. Tous les fromages frais ont une DLC de 24 jours. Les fromages frais sont traditionnellement des fromages à égouttage lent, fabriqués à partir de laits ou de crèmes propres à la consommation humaine

(**Boutonnier and Dunant, 1990).** Ils résultent de la coagulation à prédominance lactique du lait, combinant souvent l'action des ferments lactiques et celle de la présure. Ces fromages se caractérisent par l'absence d'affinage après les étapes d'égouttage et de moulage **(Corrieu and Luquet, 2005)**race de cette origine dans le mot fourme, appellation linguistique régionale courante et reprise par les appellations commerciales de certaines spécialités fromagères. À noter également le latin forma qui désigne un moule à fromage.

B.3. Composition du fromage frais

Tableau03 : Illustre la composition moyenne d'un fromage frais pour 100g **(Eck and Gillis, 2006).**

Constituants en (g)	**Fromage frais**
Eau	80
Glucides	04
Lipides	07,5
Protéines	08,5
Calcium	100
Sodium	40
Vitamines en (unité internationale)	170

B.4. Transformation du lait en fromage

La transformation du lait en fromage comporte trois étapes principales : la coagulation, l'égouttage et l'affinage. L'étape d'affinage n'existe pas dans le cas des fromages frais **(Evette, 1975).** Un bon rendement fromager dépend de la qualité du lait réceptionné tels que sa composition chimique, sa richesse en caséines, sa charge microbienne, la nature de sa microflore et son aptitude au développement des bactéries lactiques. Elle dépend aussi de son comportement vis-à-vis de la présure **(Remeuf et al., 1991).**

- **Coagulation du lait**

La fabrication du fromage nécessite une phase de coagulation du lait, qui permet l'expulsion plus ou moins grande d'une partie de l'eau et de la matière soluble (le sérum). On obtiendra ainsi un caillé ou un fromage non affiné **(Lenoir et al., 1983).**

La coagulation 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 26 acidification ou par actions d'enzymes coagulantes ou encore par l'action combinée des deux **(Eck and Gillis, 1990).**

- **Egouttage :**

L'égouttage est un phénomène dynamique qui se caractérise par la quantité de lactosérum éliminé durant le temps. En effet, il fixe les caractéristiques physiques (pH et aw) et chimiques du caillé et par conséquent l'affinage du fromage **(Weber, 1997).** Le processus d'égouttage est lié à des facteurs directs correspondant à des traitements de types mécaniques et thermiques, des facteurs indirects (acidification et coagulation enzymatique) et des facteurs liés à la matière première (richesse en caséine laitière, en protéines solubles et en matières grasses) **(Ramet, 1997).** Selon le type d'égouttage effectué, deux catégories de fromages se distinguent : le fromage égoutté en moule et le fromage égoutté en vrac sous forme de pâte où l'égouttage passe avant le moulage **(Eck and Gillis, 2006).**

- **Salage :**

Le salage peut s'effectuer selon deux techniques:

salage à sec par saupoudrage superficiel, par frottage ou par incorporation dans la¬masse du caillé salage en saumure par immersion dans une solution saturée en NaCl.¬

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

• d'assurer un complément d'égouttage .

• de contribuer éventuellement à la formation de la croute.

• de régler l'activité de l'eau (AW) du fromage qui oriente et freinte les développements microbiens et les actions enzymatiques au cours de l'affinage.

• d'accroître le potentiel organoleptique fromage **(Mahaut et al., 2003).**

- **Affinage :**

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

d'une part, la matrice issue de la coagulation et de l'égouttage du lait présente une très grande hétérogénéité physicochimique.

d'autre part, les enzymes intervenant dans l'affinage ont plusieurs origines **(Jeantet, 2007).**

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

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

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

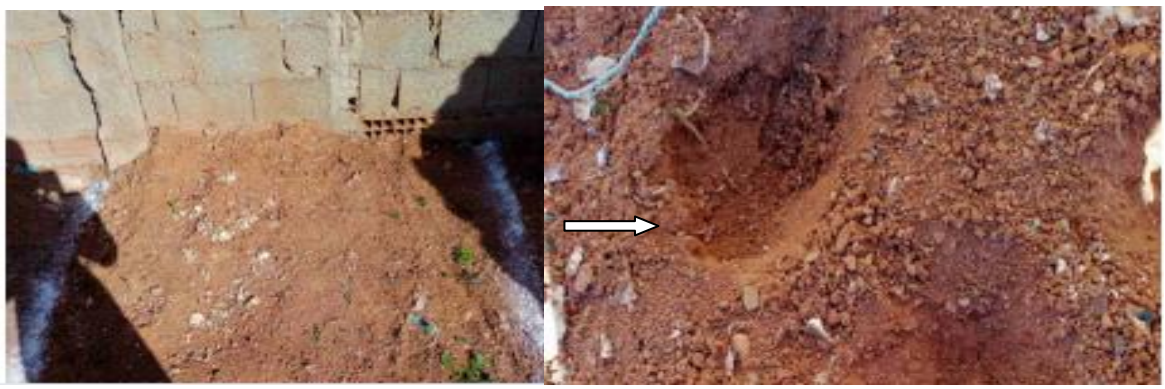
Chapitre II : Matériels et méthodes

1- origines de la souche

La souche identifie comme *Bacillus subtilis* est une souche locale isolée a partir du sole à proximité de laiterie BOUSKEN par étudiante de M2 spécialité Microbiologie , l'université de YAHIA FARES MEDEA Le choix de cette souche repose essentiellement sur son aptitude a partir à produire les coagulasse .

Elle est conservée à 04°C sur gélose inclinée. Un repiquage est nécessaire pour garder la vitalité de la souche (souche jeune).

Le milieu de la culture utilisé est de type semi solide (fermentation en surface) dans le but d'optimisé une meilleure culture donnant une meilleure production d'enzyme nous avons utiliser le son de blé comme substrat de fermentation.



Forage 10 Cm-15Cm



Figure 04 : Un prélèvement du sol

I-1 Méthode d'isolement de la souche

Une première étape du travail a consisté à isoler des microorganismes susceptibles de produire des enzymes coagulant le lait, à partir du sol.

La terre utilisée pour la recherche des microorganismes a été prélevée à proximité de la laiterie Bousken Médéa, précisément aux alentours du local contenant les sacs de poudre de lait. 100 à 150 grammes de sol sont pris à des profondeurs variant entre 3 et 15cm à l'aide d'une spatule stérile et stockés dans des contenants stériles.

Les échantillons de terre sont tamisés dans des tamis métalliques à maille de 2mm de diamètre environ. Le produit de tamisage est recueilli sur des grandes feuilles de papier sulfurisé ; 50 à 100g sont préservés en flacon stérile. Puis de manière aseptique, 10 gr de terre tamisés sont pesés, puis broyés le plus finement possible afin de libérer au mieux les microorganismes. La terre est transférée dans une fiole de 100ml, complétée avec de l'eau physiologique stérile. Le mélange est ensuite homogénéisé pendant 20 minutes sous agitation magnétique **(Davet et Rouxel, 1997).** Nous obtenons ainsi une dilution au 1/10.

A partir de là nous préparons les autres dilutions (1ml de10-1 dans 9ml d'eau physiologique stérile pour avoir 10-2 et ainsi de suite jusqu'à 10-9

Les milieux de culture à utiliser sont coulés en boîte de Pétri (d= 9cm), puis ensemencés (pour les dilutions 10-3 à 10-9) par étalement de 0,1 ml de chaque dilution à l'aide d'un râteau à la surface des milieux .

En ce qui concerne l'isolement des bactéries, le milieu employé est le milieu plat count Agar (P.C.A.**), l'Amidaze** a 2,% de 10% lait écrémé UHT e) à L'incubation s'effectue à 30°C pendant 48h à 72h. est ajouté 10% lait écrémé UHT. L'incubation a lieu à 25° pendant 3 à 4j.

Dans un premier temps, nous ferons référence aux méthodes utilisées lors de l'étude portant sur les bactéries.

Cinquante grammes d'échantillons de sol ont été recueillis près d'une usine de production laitière. 10 g de terre tamisé sont pesés broyés finement pour libérer au mieux les microorganisme une petite quantité de sol a été homogènes sous agitation magnétique

pendant 20 min avec 90ml d'eau des dilution en série ont été effectué pour chaque échantillon et 0.1 ml de la dilution appropriée a 10^{-9} a été étale sur un milieu d'agar de comptage de plaque (PCA) contenant 2 % (P/V) d'agent antifongique .

DA'MIDAZE : pour prévenir le croissant de ce fongique et 12%(P/V) de lait écrème en poudre stérile.

Les plaque en été incubée a 30 c° pendant 48 h pour l'énumération de la protéase coagulant le lait produisant une souche costéolytique pour la présence d'un halo clair autour de la colonie .

Les colonies ayant des différences morphologies distincte telle que la couleur (technique de GIRAM) la forme et la taille ont été sélectionné et purifiées en utilisant le même milieu le pouvoir coagulant de toutes les isolants a été vérifiée et examiné au microscope avant les préparation du stock .

Les isolats bactérien a Gram positif identifiés comme *BACILLUS* ont été purifiés et les souches sélectionnées montrant une activité coagulante ont été moins teneuse conservation sur gélose.

II-1 Obtention de l'extrait coagulant de *Bacillus*

Revivication de la souche Bacilus Subtilius :

La souche conservé à 04 C° sur un milieu gélose incliné a été repiquée dans des tubes é essai un bouillon nutritif ces dernier sont incubés à 30 C° pendant24h.



Figure 05 : La souche de *Bacillus Subtilisis*

La culture bactérienne est ensemencé sur les boites de gélose nutritive est incuber à 30 C° pendant 02h.

II- 2- Préparation de l'inoculum

A l'aide d'une anse de platine stérile on gratte légèrement la surface de la gélose nutritive (GN) de façon à obtenir 5 à 6 colonie : ensuite ces colonies ont été submerge dans une solution stérile (eau physiologique)5 ml dans un tube a essai ce dernier est agité a l'aide d'un vortex.



Figure 06 : Préparation de l'inoculum

Après l'agitation la suspension est ajustée au standard MC Farland 5 à l'aide d'un spectrophotomètre ce qui correspond a une densité optique (DO) de 0.9 a une longueur d'onde de 600 nm.

Ce tube à été considérer comme une standard de turbidité pour comparer la turbidité d la suspension bactérienne : en examinant les tubes sur une fond blanc.

Tableau 04: Absorbance des différents MC Farland standard à 600 nm

MC farlond	Standard	0.5	1	2	3
Approx cold		1.5	3	6	9
Absorbance		0.08	0.258	0.452	0.583

II-3 . Préparation et inoculation de milieu de culture

Pour la fermentation semi solide dont la préparation comme suit :

Le son de blé est distribué dont des erlenmeyers a 250 ml 30g dont chaque erlenmeyers en plus de 2.5 g de lait écrème (qui contient le lactose comme source d énergie +2 g caséine (comme inducteur de la production d'enzyme) + 4 g de glucose 3g/l extrait de levure + Na Hpo_4 = 3g/l +50 ml (l'eau distillé) avec optimisation : changement de température T° changement de quantité de son de blé.

Les erlenmeyers sont bouchés avec du coton et couffes de papier haute température). Il sont alors stérilisée à l'autoclave a 121 c° pendant 15min puis on introduire dans chaque erlenmeyer 5ml de l'inoculum d'incubation à lieu 30C° pendant 24 h et a 35 ° pendant +24.

FERMENTATION SOUS AGITATION



Figure 07 : Inoculum avant et après la filtration

II-4 . Extraction de la protéase

Le contenue est filtré à travers un filet de gaz puis centrifugé à 4000 tours pendant 4min à 4C° dans une centrifugeuse a froid **(reo et mathar1976)** le surnagent récupéré constitué l'extrait enzymatique brut.



Figure 08 : L'obtention de l'extrait enzymatique brut

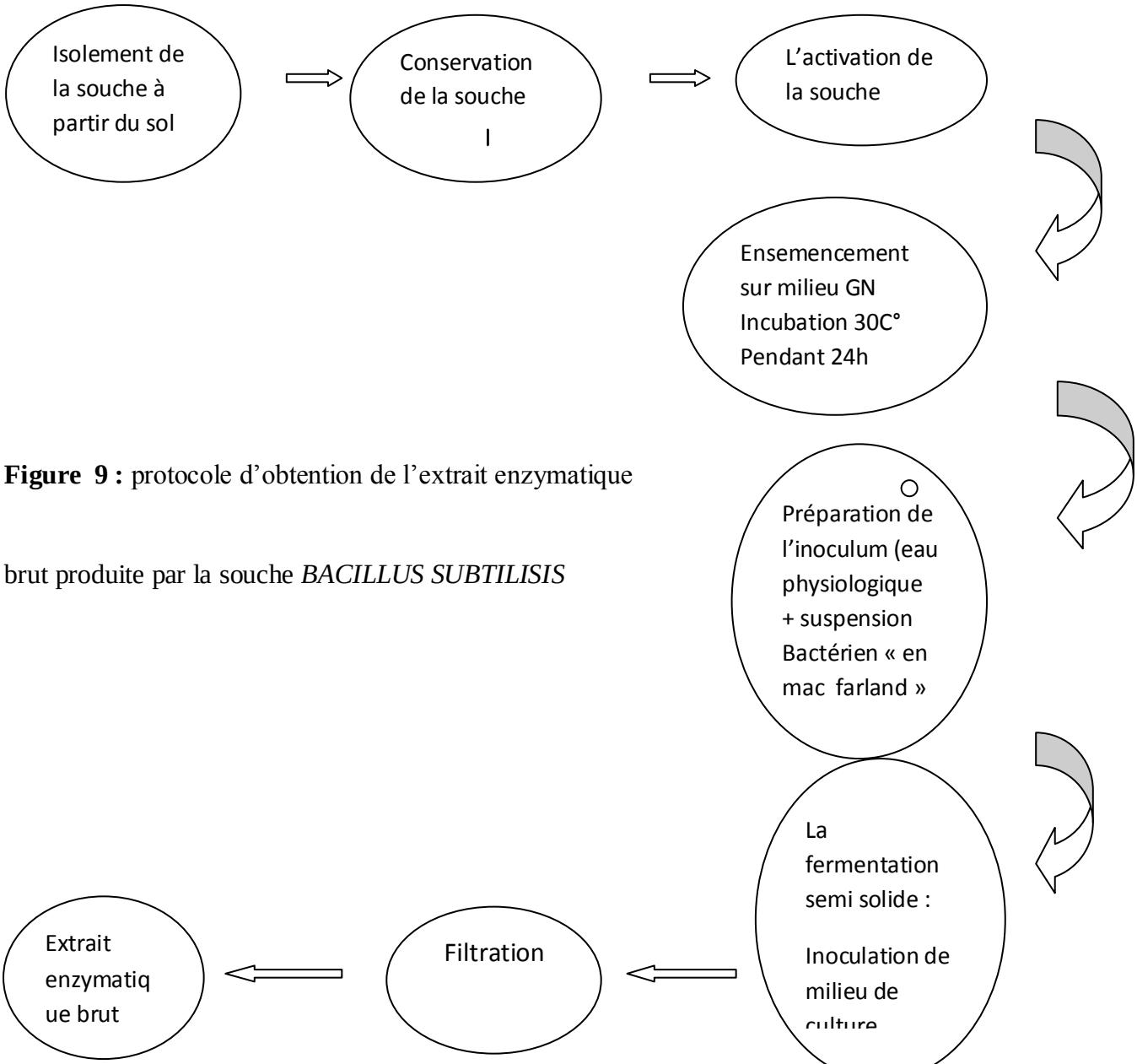


Figure 9 : protocole d'obtention de l'extrait enzymatique

brut produite par la souche *BACILLUS SUBTILISIS*

II.5 Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

II.5.1.Mesure des activités enzymatiques

II.5.1.1.Mesure de l'activité coagulante (AC)

-L'activité coagulante est déterminée selon deux méthodes :

a- la méthode de Berridge (1945) modifiée par Collinet al. (1977)

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

12 g de poudre de lait écrémé « lowheat » standard de **Berridge** sont dissout dans 100 ml d'une solution de CaCl2 à 0,01M sous agitation magnétique pendant 30minutes ; le pH est d'environ 6,5. Le substrat ainsi reconstitué est reparti dans des tubes à essais à raison de 10 ml par tube. Les tubes sont placés dans un bain marie à 35°C pendant 30 min.

1ml de l'extrait enzymatique est alors ajouté au substrat. Le tube est agité et on note à l'aide d'un chronomètre, l'apparition de la première floculation sur la paroi du tube.

L'activité coagulante est exprimée en unité présure (Up.).(Voir annexe 01)

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

Avec :

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

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

t : temps de coagulation en secondes.

b- la méthode de Soxhlet

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

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

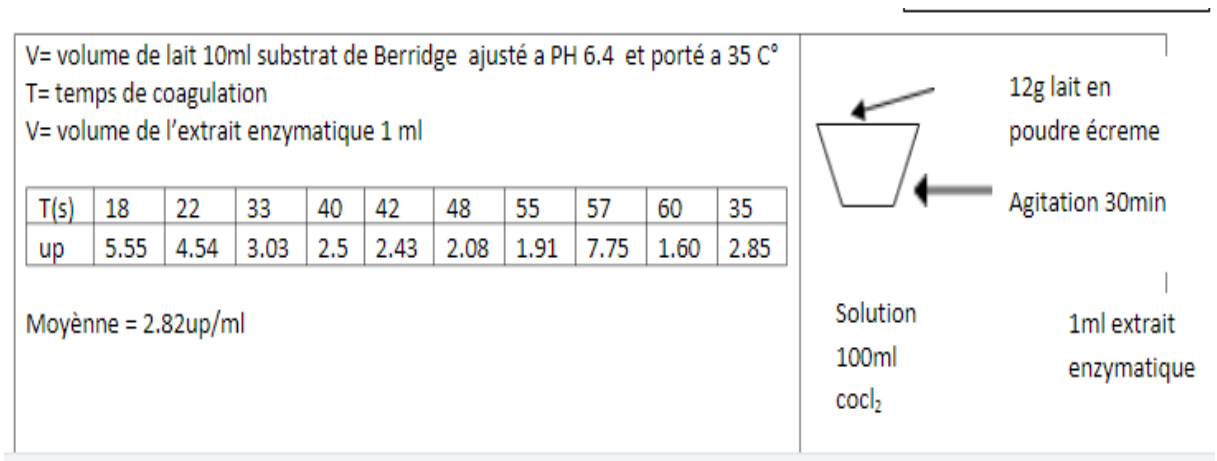
$$Up = 10V/v$$

Tableau 05 : Représente la coagulation de lait dans différents temps

V= volume de lait 10ml substrat de Berridge ajusté a PH 6.4 et porté a 35 C°
T= temps de coagulation
V= volume de l'extrait enzymatique 1 ml

T(s)	18	22	33	40	42	48	55	57	60	35
up	5.55	4.54	3.03	2.5	2.43	2.08	1.91	7.75	1.60	2.85

Moyènne = 2.82up/ml



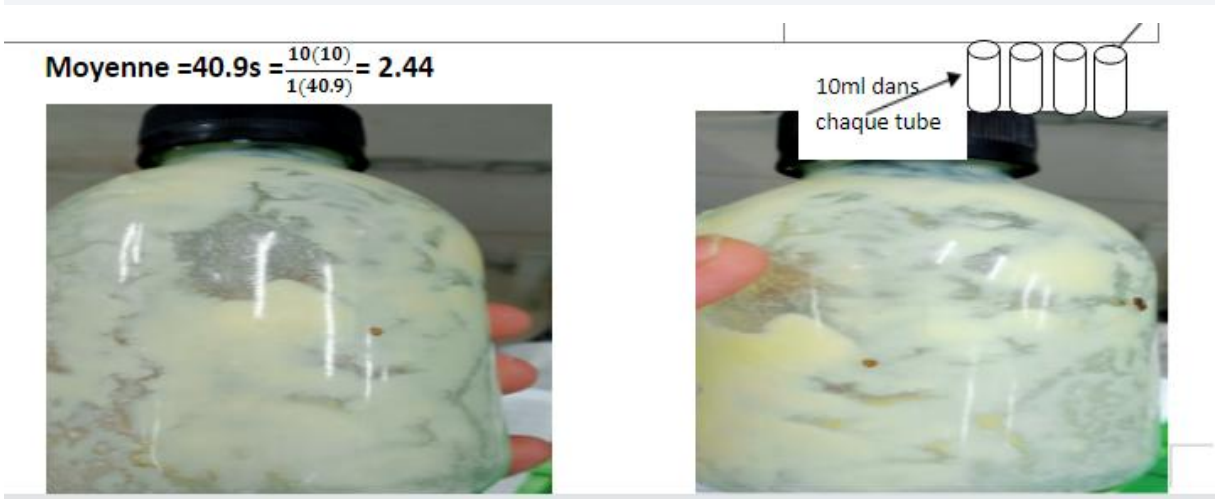


Figure10: Schéma représente la préparation des dilutions

II.5.2. Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminé parla méthode décrite par **SILVA** et de **SHIHET** ALLe mélange réaction est composé de 0..4 ml de 0.5 % de conserve (sigma) (p/u) dans l'eau distillé 0.40.2mol/l de tampon acétate à PH 5.5 et 0.2 ml de l'enzyme brute la réaction a eu lieu dans un bain a 35 C° et au bout de 30 minute la réaction à été stoppé en ajoutant 1ml d'acide trichlor acétique à 10% (TCA) 2 ml filtrat ci-dessus a été ajouter de NaOH à 5ml (0.28N)est une solution de 1.5 ml de réactif de phénol /solution de phénol de folin-cio caltea eau =1 :2) . aprés que le mélange à été moi retener à 35 C° pendant 15 min. La densité optique (Do) a 660 mn a été mesuré l'activité protéolitique a été exprimés en termes d'unité (PA) correspondront a Do 660 mn.

3. Détermination de l'indice AC/AP

Selon **abdelfatah et 1974 et al ., abderrahmene et al., 1990** le rapport de l'activité couagulant sur l'activité protéolitique (AC/AP) pour les préparations enzymatique réservent un indice d'appréciation de la qualité des présure de remplacement par rapport à la présure de référence sa mesure permet de déterminer l'aptitude d'une préparation enzymatique à coaguler le lait au même titre que la présure

Dosage de protéine :Le dosage des protéine totale est déterminer pour la méthode de LOWRG **(lowrg et al ., 1951)**c'est une MESURE CALORIMETRIQUE ou l'addition d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis des réactif de FOLIN-CIOCALTEU à une solution protéine donne une coloration BLEU FONCEE cette coloration résulte de la réaction de l'acide phospho-tungston –molybdique par la tyrosine .La lumière à 750 nm /le dosage de protéine s'effectué a cette longueur d'onde en utilisons une spectrophlom

La centration on protéine de l'échantillon analysé est déterminer en se référant par projection à une courbe d'étalonnage DO+F(c) où l'albumine sérique bovine commercial (BSA) est utilisé comme protéine étalon **(boudjnah 2012).**

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

Détermination des conditions optimal de l'activité coagulante la caractéristique d'extrait enzymatique brut consiste à la détermination des conditions optimale de l'activité coagulante en fonction de certains facteurs .

La mesure de l'activité coagulante selon la méthode de mesurent le temps de coagulation selon la méthode de (**berridge 1945**).

4. Détermination de la méthode température optimale de l'activité

La température optimale de coagulation du lait a été déterminée an portant le lait à différente température 30à 35 C° avec un intervalle de 5 C°

L'influence du PH du lait

L'influence du PH du lait sur l'activité coagulant de l'extrait enzymatique à été déterminée en faisant varier le PH de lait de 5.0 à 8 avec un intervalle de 0.2 en utilisant du HCL 0.1 N et du NaOH0.1N.

5. Détermination de concentration optimale du Ca CL_2

D'influence de la concentration en $cacl_2$ Sur l'activité coagulante à été déterminer en faisant varier la concentration du lait en ions $CACL_2$ de 0.01 à 0 0.08 M avec un intervalle de 0.1M . Influence de la concentration en extrait enzymatique .
Les activités coagulantes on été déterminée en faisant varier la concentration en protéine de l'extrait enzymatique 0.02 à 175 mg /ml avec intervalle de 0.02 mg/ml.

METHODE :

La purification des effectuée par contre repiquage successif jusqu'a l'obtention de colonie de même taille même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches **(Idou et al 2009).**

Examen macroscopique Il consiste a relever la taille , La forme ,la couleur des colonies, des cultures bactérienne sur leur milieu de culture

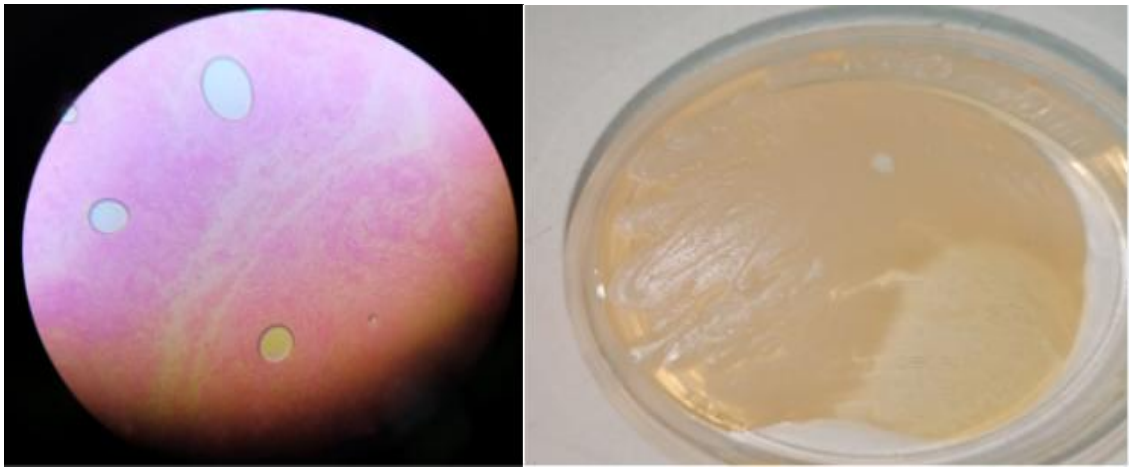


Figure 11 : Observation macroscopique du genre du bactérie *BACILLUS SUBTILISIS*

Les observations microscopiques effectuée à l'aide d'un microscope optique avec un objectif 100 à immersion permettent d'examiner de colonie à l'état frais et après coloration de

gram.

L'état frais : on prépare avant tout une lame on met au dessus une goute d'eau distillé à l'aide d'une pipette après un relèvement a partir d'une colonie on étal sur la lame ensuite on recouvre avec une lamelle le liquide ne doit pas déborder.

Coloration du Gram : cet examen est effectuée avec l'objectif 100 à immersion après la coloration de Gram il sert à classer la souche (Gram +ou-) et à déterminer la forme unitaire de cellules ainsi qui leur mode de regroupement (**gurand 2003).**

Guiroud j p (2003) microbiologie alimentaire donod RIA P 696 -144) .

6. Le protocole de la coloration de gram Technique

- Réaliser un frottis et fixer la bactérie
- Plonger la lame dans le violet de gentian (ou cristal violet) phénique pendant 1 min
- Laver la lame à l'eau distillé
- Plonger la lame dans une solution de lugol pendant 1min
- Laver à l'eau distillée
- Décolorer dix seconde à l'alcool
- Rincer immédiatement à l'eau distillée
- Plonger la lame dans (la fuchsine) phénique pendant 1 min
- Laver la lame à l'eau distillée
- Sèche la lame en la tamponnant avec du papier joseph
- Observer à l'objectif x 100à l'émersion dans l'huile

Examen microscopique

Il consister à relever la taille de forme, la couleur des colonies des culture bactérienne sur leur milieux de culture

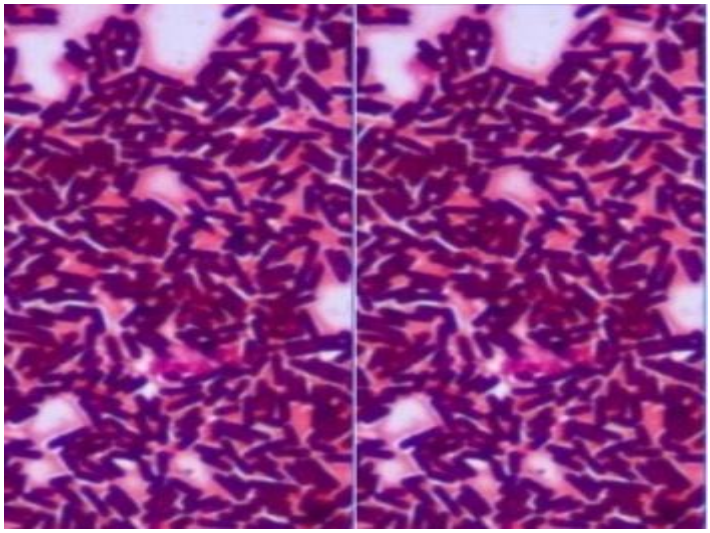


Figure 12 : Observation microscopique de *Bacillus subtilisis* (original ,2022)

7. Identification biochimique :

Recherche de la catalase : l'activité catalytique permet la dégradation de l'eau exogène en oxygène et en eau par la mise en contact des colonies avec quelque goute d'eau oxygéné **(GUROUD 2003)** un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygéné sous l'action de l'enzyme a tester pour notre souche positif)

7.1 Test de la coagulasse :

La détection catalytique de la coagulasse s'effectuée en introduisant des colonies isolée *Bacillus subtilis* ' dans un micro tube stérile contenant 0.5 ml de plasma de lapin le mélange est ensuite colonie à 37C° et examiné après 04 heur puis 24 h un teste positif se traduit par la formation d'un coagulant **(JOFFIN ET LEYRAL .2001).**

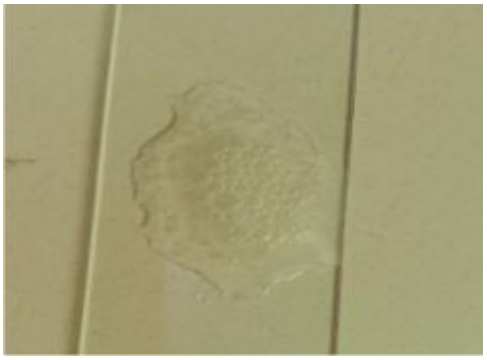


Figure 13 : Teste coagulasse

8. Ensemencement des galeries :

8.1 Préparation de la galerie

Réunir fond couvrer d'une boite d'incubation et repartir environ 05 ml d'eau distillés ou déminéralisé dans les al réales pour créer une atmosphère humide.

Inscrire la référence de la souche sur longuette latere de la boite Sorti la galerie de son emballage individuel Placer la galerie dans la boite d'incubation.

8.2 Préparation de l'inoculum

Ouvrir une ampoule d'API medium ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile sons additif.

A l'aide d'une pipette pasteur prélever une colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heur).

Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être inoculée .

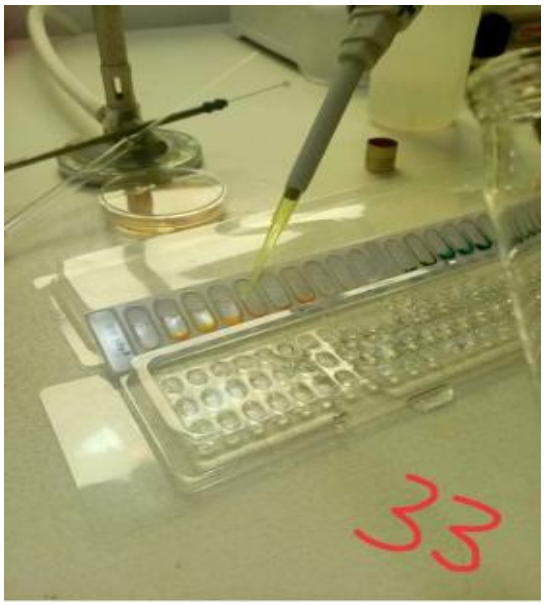


Figure 14 : L'ajoute de la suspension bactérienne.

8.3. Inoculation de la galerie

A l'aide d'une pipette pasteure stérile -remplir les tubes de la galerie avec API medium ensemencé pour évité la formation des bulles au fond des tubes – poser la pointe de la pipette sur le coté de la cupule en inclinant légèrement la boite d'incubation vers l'avant

* créer une anaérobiose dans les testes (ODC – ADH -)(Api 20 E) en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former une ménisque convexe .

Pour les restes CIT- VP- CEL – remplir tubes et copule (Api 20 E).

* Renfermer la boite d'incubation

* incubation à 37 °C pendant 18-24 heur

8.4. Lecture de la galerie

Après incubation lire les réactions au tableau de lecture (annexe n3)

En ajoutant 1 goutte de chacun des réactif suivant :

- Teste VP : VPI ET VP2 (API 20 E).

- teste NIT : NIT Et NIT2 (//).

- Teste TDA / KOVACS (Api 20 E)



Figure 15 : La lecture du résultat de la galerie API 20

9.1. Détermination de profil numérique

Sur la fiche de résultat les testes sont séparé par groupe de trois et une valeur 1.2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnement à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à réaction positive on obtient 7 chiffre qui constituent le profil numérique et identification est réalisé à l'aide du catalogue analytique et logiciel d'identification

9.2.1. Galerie miniaturisée API 20E

Les galeries ont été ensemencées à partir de souches de 24h cultivées sur milieu PCA pour chaque souche, une colonie a été prélevée et mis en suspension dans 5 ml d'eau distillée stérile (Mac Farland 0,5).

Une première série de galeries a été ensemencée où chaque tube de la galerie a été rempli selon les indications du fabriquant. Certaines lectures n'étant pas très franches, des Galeries ont été recommencées en modifiant les conditions d'ensemencement : les souches s'étant révélées aérobies strictes, nous avons proposé, en ce qui concerne les tests relatifs à l'utilisation des sucres, d'ensemencer tubes et cupules afin d'améliorer la lisibilité des résultats.



Figure 16 : gelerie API 20

9.2.2. Galerie miniaturisée API 50 :

Ces galeries miniaturisées permettent d'étudier l'utilisation par les souches bactériennes de 50 substances carbonées, soit par oxydation (utilisation du milieu BYNB: Buffered Yeast Nitrogen Base), soit par fermentation (utilisation du milieu B dans le cas des Bacillus).

Après sélection de certaines souches, au total 2 galeries ont été ensemencées, respectivement deux pour la souche N

La première série de galeries a été ensemencée avec du milieu **BYNB** à 7g/l d'agar (étude de l'oxydation des «sucres») pour les souches N l'ensemencement a été fait à l'aide d'ampoules API 50CHB/E medium destiné à



FIGURE 17 : galerie API 50

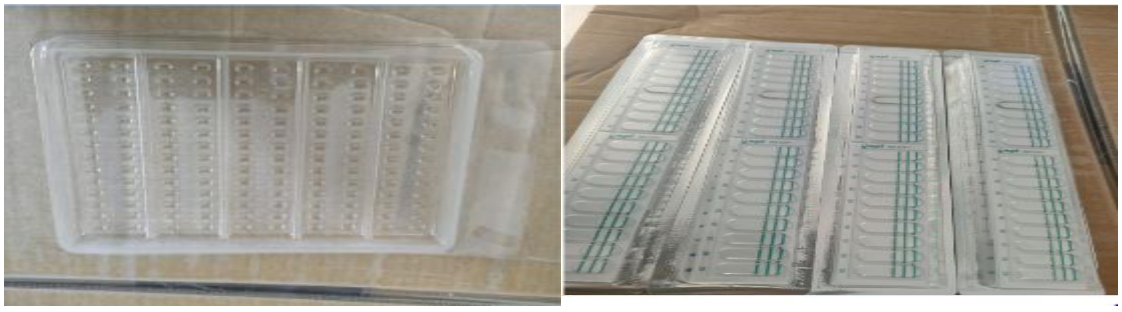


Figure 18 : Représente une galerie API 50

10. MATERIEL

Pour la réalisation de notre étude on à utilise un ensemble de matériel et appareille

*autoclave (avantage - lab al02-03)

*centrifugeuse réfrigérer (sigma 3-30k)

*bec benzen

*les étuves

*microscope optique

*réfrigérateur (BEKO)

*pipette pasteur

*les micropipettes (MICROLIT)

*VORTEX (XH-B)

*balance (KERN)

*balance de précision(KERN)

*bain marie (Mamert)

*erlenmayer

*PH mètre (hanna)

*agitateur magnétique (stkart orbital shaker)

*média comment la (Amidaze) antifongique

*milieu de culture

*GN

*PCA

10.2. Produit chimiques et réactifs

Tableau 06 : Les réactifs et produits chimiques

- FUSHINE DE ZIEHL - LuGoL - ALCOOL - Caséine - EXTRAIT DE LEVURE - Na_2HPO_4	- GLUCOSE - SON DE BLE - LAIT ÉCRÉMÉ - $CACL_2$	PRESURE : est une enzyme qui hydrolyse la liaison pHe 105 M et 106 de la caséine (fournie par la laierait BOUSKEN).

11. Essai de fabrication du fromage frais par l'utilisation de l'EEB

11.1. Étapes de fabrication du fromage

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

Ces essais ont été réalisés au niveau du laboratoire de biologie médicale **docteur Kamel YEDREG** à Béni Slimane Médéa.

Étant donné, l'activité fortement protéolytique de l'extrait enzymatique de ***Bacillus subtilus***, nous avons choisi d'élaborer un fromage frais, afin d'inhiber cette activité juste après coagulation, et limiter ainsi les pertes en rendement fromager .Nous avons élaboré deux types de fromage frais dans les même conditions se différenciant par :

Ø **Type A :** coagulation par EEB.

Ø **Type B:** coagulation par présure.

Le volume de lait total utilisé est de 2 L issu de la ferme ITELV celui-ci est divisé en

bacs de 2 litres de contenance. Le procédé de fabrication utilisé a été proposé par

Harbutt, (2010) pour les fromages frais.

11.2. Préparation du lait

A . 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 19 : La pasteurisation du lait.

B. Ensemencement du lait traité

La maturation du lait est réalisée par Les ferments ou levains lactiques sont des cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques qui se multiplient dans le lait et dans les fromages, assurent deux fonctions essentielles :Abaisser le pH du milieu en transformant le lactose en acide lactique. Contribuer aux caractères organoleptiques des fromages en libérant les systèmes enzymatiques.

C .Emprésurage

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

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

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



Figure 20 : L'ajoute de présure avec une micropipette.

D. D'écaillage et délactosage

Cette étape consiste a découpé le caillé en grain de petites tailles sous forme de grain de mais, l'outil utilisé lors de cette étape est le tranche – caillé **.**Ensuit délactosage " lavage du caillé " l'opération qui consiste à remplacer une partie du sérum par de l'eau

pour abaisser la richesse du caillé en lactose pour éviter une sur acidification (réduire l'acidité par l'ajout de l'eau) **(Majdi, 2009).**

• Force de présure : 3 à 4 g /100 ml dose 0.06 g/2L.

• Force EEB 1/100 2 ml /2L.

E. La cuisson du caillé

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

F. Pré pressage, moulage, pressage

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



FIGURE 21 :préparation porur la filtration



Figure 22: Egouttage (séparation entre le caillé et le lactosérum)

Donner au fromage sa forme définitif en utilisant des moules en plastique alimentaire **(Majdi, 2009).**

I. Le salage

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

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

Le sel joue un triple rôle : Il complète l'égouttage et contribuera ainsi à la formation de la croûte. Il règle l'activité de l'eau et ainsi favorise ou freine le développement des microorganismes tout en régulant les activités enzymatique.

Il révèle la saveur propre du fromage en influençant le goût et en renforçant les arômes.



Figure 23 : Le salage.

G .Moulage : Le moulage est la répartition du caillé dans des moules perforés, en métal ou en matière plastique, dont la forme et les dimensions varie avec les types de fromages. La mise en moule se fait manuellement ou automatiquement **(VEISSEYRE, 1975).**



FIGURE 24 : le moulage

12. Résumé des étapes de fabrication du fromage frais :

1.Lait pasteurisé à 80°C pendant 20 secondes

2 .Maturation à 42°C pendant 1h

3.Ajoute de $CaCl_2$ (2.5g/2L)

4.Ajoute de ferments lactiques

5.Emprésurage

6.Présure (t= 42°C) dose (0,06 g)

7.Découpage et brassage

8.Cuisson à 53°C pendant 45min

9.EEB (t= 55°C) dose (2 ml)

10.Cuisson à 60°C pendant 45min

11.Soutirage de lactosérum

12.Moulage et pressage 4h

13.Saumurage (12° à Fromage frais)

13. Analyses physico-chimique du fromage

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

A. Le pH

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

B. Détermination de l'acidité

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

(NF V04-206, 1969).

Expression des résultats :

Avec :

N : normalité de NaOH (mol/l).

V : volume de NaOH titré (ml).

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

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

C. Détermination de la teneur en matière grasse

La teneur en matière grasse du fromage est déterminée par l'utilisation de la méthode acido-Butyrométrique de Van Gulik **(AFNOR, 1993) .** Le principe de cette méthode repose sur la dissolution de la matière protéique par acide sulfurique à chaud. La séparation de la matière grasse est obtenue par centrifugation dans un butyromètre de VanGulik. Cette séparation est favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool iso- amylique. **D°= (N.V .100/20)**

Expression des résultats

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

formule suivante :

Avec :

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

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

D. Détermination de l'extrait sec total

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

Avec :

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

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

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

E. Détermination de l'extrait sec dégraissé (ESD)

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

F. Détermination du rendement fromager

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

Rdt = 10 x ESD x Pds/V

Rdt : Rendement fromager.

ESD : Extrait sec dégraissé.

Pds : Poids.

V : Volume du lait mis en oeuvre.

14. analyse microbiologique du fromage

A. Objectif

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

B. 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}.

C. 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 est sera alors au 1/100 ou $10^{-3.}$

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

D. Les germes recherchés pour cette denrée et leurs dénombrements

- Ø Les *Staphylococcus* aureus
- Ø *Clostridium* .
- Ø les *Salmonelles* .
- Ø Les Coliformes totaux **.**
- La composition des milieux de culture **.**

Chapitre III : Résultat et discussion

1* Identification de la souche

La souche	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Gram	Largeur en (mm)	Activités coagulante
Bacillus subtilis	Colonies sèches mâtes plats bordures denteleés	Petite Bacilles en faisceaux pas de spore en apparence	+	6mm	2.81

Tableau 07 : Bactérie possèdent une enzyme coagulante

2* Observations macroscopique et microscopique

Souche	Observations
Bacillus subtilis	Colonies (1-2mm) très sombre

Pour l aspect microscopique : c'est un Bacilles Gram + présente sur milieu PCA + le lait des auréole caractéristiques de l hydrolyse de la caséine .



Figure 25 : la culture de la bactérie *bacillus subtilis*

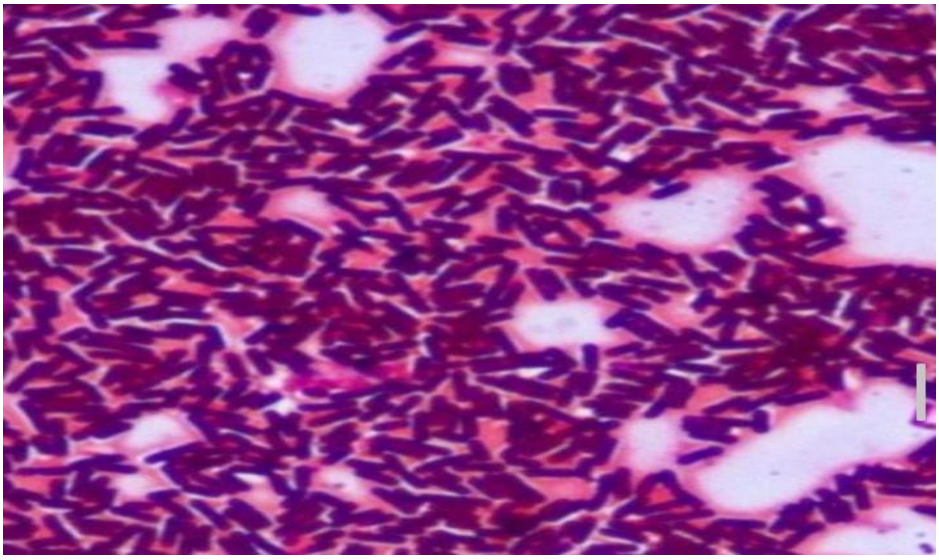
- 

Figure 26: observation microscopique de la souche *bacillus subtilis* (original,2022)

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 27: Présente Test de catalase positive +

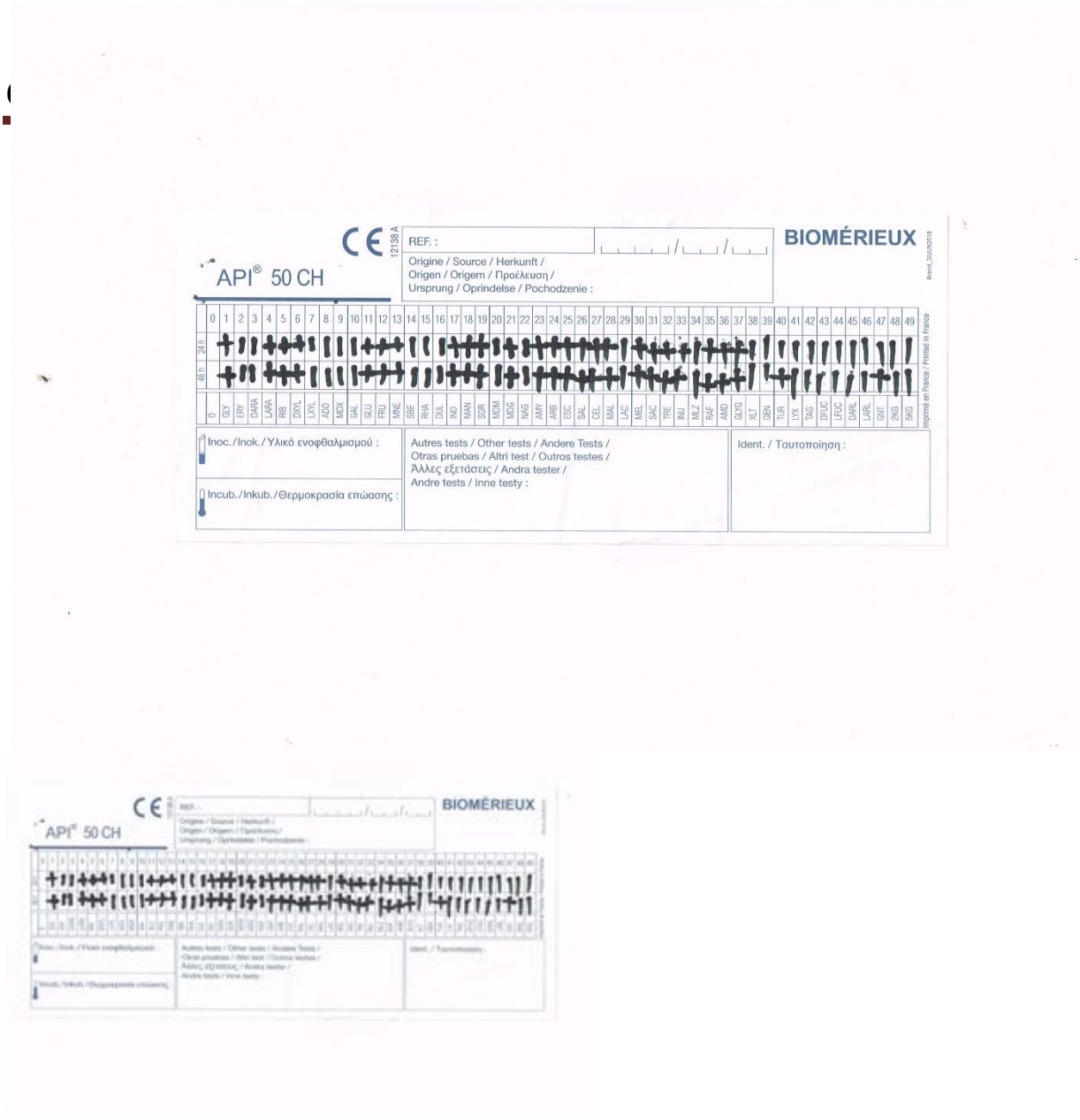
Galerie API 20 E

Souche	OnpG	AdH	LDC	ODC	Citrate	H2S	Urée	TDA	Indole	Vp	Gelatinase	Glucose	Mannitol
Bacillus subtilis	+	–	–	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+
/	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Saccharose	Melibiose	Amygdales	Arabinose						
/	+	+	–	+	–	+	–						



Figure 28 : Lecture de la galerie API 50.

Figure 29 : Lecture à 24h et 48h de la galerie Api 50cH pour la souche Bacillus subtilis.
A partir du résultats de Galeries 50 CH et du tableau d identification de la souche :c est une Bacillus subtilis



Résultats de l’ identification :

Après avoir envoyé le résultat au site(annexe) pour lire le résultat et selon le catalogue. Nous avons reçu le résultat suivant : Bacillus Subtilis.

3* Caractérisation de l extrait Enzymatique brut

caractère Apparent de l extrait Enzymatique :

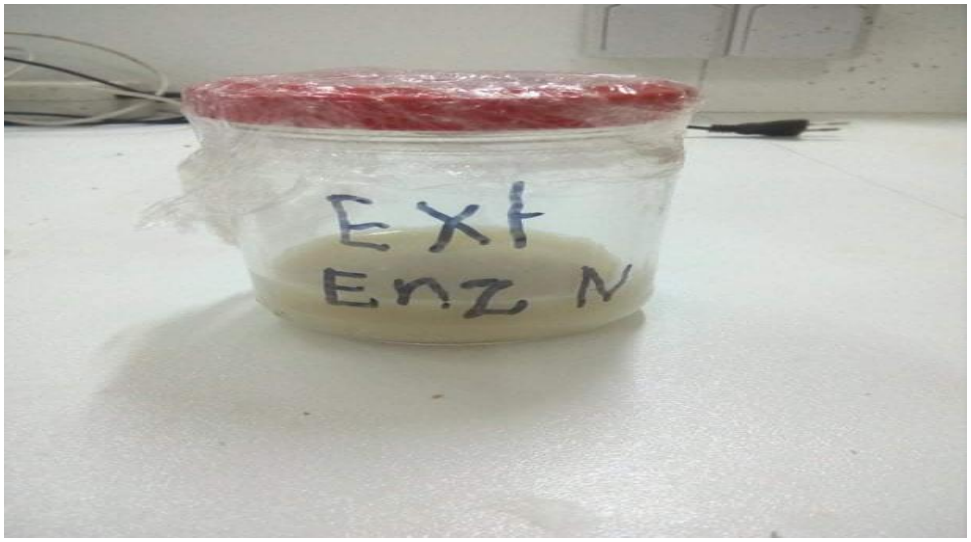


Figure 30 : présente l extrait Enzymatique brut notre extrait Enzymatique et de couleur brun.

4* Activités coagulante de l'EEB

Après l' extraction ,l activité coagulant de l extrait Enzymatique brut issue de **Bacillus subtilis** a été déterminé par les méthode de **soxhletet** de **Berridge** .les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau suivant :

/	Activités coagulante Up	Force coagulante US
EEB de Bacillus subtilis	2.81	1/586

Tableau 08 : Présent activités et la force de notre souche

l activités coagulant de l extrait Enzymatique issue de **Bacillus subtilis** est exprimée en force coagulante selon le principe. De **soxhlet** (décrit précédemment) la force coagulante de l'extrait brut Enzymatique est de 1/586 ce qui implique que un ml d extrait Enzymatique coagulé 586 ml. De substrat de Berridge.de même notre activité coagulant est de l ordres

2.81up/ml

Préparation Enzymatique	Unité présure (up) /ml	Force coagulante (F)US	Référence
Bacillus subtilis	2.81	1/586	
B.amyloliquefaciens	0.41	100	
ECD2	0.155	34.44	Cahiers agricultures vol14..n5, septembre -octobre 2005
PBC	0.149	33.11	Cahiers Agricultures vol 14 n5, septembre octobre
Aspergillus Niger	0.373	82.88	Bensmail souhila 2012
Rhizomes de gingembre	5.88	1411.76	Yahia Mohamed zhor yakhou Naima 2015
Mucor pusillus	0.34	1200	Mlle Nabila belhamiche2005
Pepsine de poulet	15.08+-0.86	4559+-330	ADouiFaiza2005
Présure de poulet	323.62 +- 44.56	70815+1865-	ADouiFaiza2005
D3	13.33	3200	ADouiFaiza2005

D3 : EEB de poulet ECD2 : extrait coagulante gastrique de dromadaire âge 2ans

PBC : présure bovine commercial

Tableau 09 : Comparaison de AC de l' EEB aux Autres AC des coagulasse.

Cette valeur est bien comparé aux Activités de présure Bacillus amyloliquefaciens et aux autre données bibliographiques relative aux autre origines extrait Enzymatique dans notre

étude on remarque que la force coagulante obtenue est trop faible(voir le tableau) cependant cette comparaison n'est pas très significative étant donné que les préparations commercial sont a l'état pur contrairement a l'extrait coagulante de notre souche **Bacillus subtilis** qui se trouve a l'état brut .

Cette différence est due au milieu de culture ou de la fermentation. Dans notre étude nous avons observé une forte activité coagulante de EEB EST DE L ordre 2.81 UP/ml. Nous pouvons constater que l activités coagulante de l extrait brut de **Bacillus subtilis** est largement supérieur a EBB de B. amyloliquefacien. Activités Protéolytique :
Absence de produits Analyse physicochimiques du lait.



Figure 31 : Ekomilk pour les analyses physico-chimiques .

Cet Appareil permet la mesure. Par ultrasons a plus avantage
permet de faire un grand nombre de mesure
Résultats Affiché en 90 seconde sans besoin de la présence de l opération et plus de 10 paramètres différents

Mode opératoire

Remplir la tasse de mesure avec l'échantillon de lait à mesurer (l'échantillon ne doit pas contenir de bulles d'air) ;

Placer la tasse de mesure sur le support en plastique avec la ventouse à l'intérieur de l'échantillon .

Appuyer sur la touche MODE et à laide des deux touches à coté .

sélectionner le mode souhaité : Le type de lait . Lorsque le type de lait approprié est affiché, appuyer sur la touche OK pour lancer la mesure.

Le lait est automatiquement entrainé dans la caméra de mesure pour le soumettre au passage d'une onde ultrasonore, le message WORKING apparait sur l'écran de l'appareil et le lait, qui était entrainé dans l'appareil, est remis dans la tasse de mesure.

Tableau 10 : Composition physicochimiques du lait utilisé dans la fabrication du fromage

Paramètres	Valeur obtenu	Norme AFNOR
Acidité(D)	16	14_18
MG%	4.21	3.4_4.4
Densité 20c	1.01	1.028_1.033
Point de congélation	0.458	0.520_0.550
EsDg/l	65.01	62
Est g/l	61	58_90
pH	6.6	6.4_6.8

Tableau 11 : Composition physico-chimique du lait utilisé dans la fabrication du fromage.

Paramètres Valeur obtenue Normes (AFNOR)

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

La valeur du pH du lait est de l'ordre de 6,4, cette valeur légèrement acide pourrait s'expliquer par la teneur faible en caséines, par la nature d'alimentation ou par l'état

physiologique de la femelle et elle est conforme à la norme (AFNOR, s des analyses physico-chimiques de lait obtenu A partir d un appareil EkoMilK



Figure 26 : Détermination du pH du lait

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

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

La valeur d'acidité calculée pour ces analyses (16 °D) est conforme aux normes **AFNOR (1981)** fixé entre 14-18. En effet Selon **Mathieu (1998**), le lait de vache en début de lactation présente une acidité titrable de 19°D à 20°D.

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

L'acidité du lait peut être un indicateur de la qualité du lait au moment de la livraison car elle permet d'apprécier la qualité d'acide produit par les bactéries ou les éventuelles

fraudes **(Joffin, 1999).**

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

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

Les résultats de l'analyse montrent que la teneur en extrait sec total est conforme (74.58 g/L). Plusieurs auteurs ont montré que la variation de la teneur en extrait sec total était due à divers facteurs tels que la qualité de l'eau et sa quantité disponible pour les animaux **(Khaskheli et al., 2005).** La teneur en matière sèche du lait varie également en fonction du stade de lactation **(Bengoumi et al., 1994 ; Khaskheli et al., 2005),** des facteurs saisonniers, de l'environnement, du rang de lactation, du nombre de vêlages **(Yagil, 1982 ; Khaskheli et al., 2005).**

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



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

D'après **Lederer (1983),** un lait de très bonne qualité contient 40g/l de matière grasse, donc la teneur moyenne en matière grasse calculée présente une qualité moyenne, dans

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

D'après **Lederer (1983),** un lait de très bonne qualité contient 40g/l de matière grasse, donc la teneur moyenne en matière grasse calculée présente une qualité moyenne, dans

notre étude la valeur calculée de la matière grasse est un peu supérieure à la Norme donnée par le journal officiel qui situe entre (3,4 et 4,4 g/l).

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

5. Essai de fabrication d'un fromage frais

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

A. Analyses physicochimiques du fromage

Nous avons fabriqué deux types de fromages frais référenciés comme suit :

FEEB: fromage élaboré à partir de l'EEB.

FP : fromage élaboré à partir de la présure.

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

Résultats physicochimique des résultats de fromage

Paramètres	FP	F /EEB
pH	5	5.85
Acidité	17	10.9
Matière grasse : MG(%)	28	24
Extrait sec total : Est (%)	49.22	46.01
Extrait sec dégraissé : ESD(%)	21.01	22.03
Rapport Gras/sec (%)		

Tableau 11 : indique les résultas des analyses physicocimiques des deux fromage fabriqués

Les résultats des analyses physicochimiques indiquent que :

- **PH**

Les résultats obtenus montrent que de FEEB sont légèrement élevée par rapport au pH de FP. Alors il n' ya pas une différence comparable entre les deux types de fromage. Il est également un facteur important dans le contrôle de la croissance bactérienne dans le fromage.

Il s'avère important de noter que le pH est lie à la qualité du fromage : un pH de 5.0 correspond à un fromage de bonne qualité, alors qu'un pH supérieur à 5.2 Correspond à un fromage qui se détériore plus rapidement qu'un pH plus bas **(Alais, 1984)**

A 1 Acidité et matière grasse :

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

Le taux de matière grasse du fromage dépend de la composition du lait mis en oeuvre , ainsi que la manière de coaguler le lait et de travailler le caillé.

Extrait sec totale Cependant, nous notons un faible taux d'extrait sec total de FEEB de Bacillus Subtillis Par rapport le fromage à base de présure.

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

6. 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) (Vandewgh, 1997). 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 oeuvre.

Application numérique :

Pour le présure :

RDT =10×ESD×PDS/V

RDT=10×21,010(0 ,02÷2)

RDT=2,101%

Pour le EEB :

RDT=10×22 ,03 (0 ,02/2)

RDT =2 ,203%

Sachant que :

Volume de lait :2L

ESD de présure :21 ,01

PDS : 0 ,02kg

ESD de EEB : 22 ,03

Le rendement fromager présente un grand intérêt en industrie fromagère car il reflet globalement la répartition quantitative des constituants du lait lors de L'égouttage. Il permet donc de juger pour un type de fromage donné si la fabrication a été menée dans de bonnes conditions.

On remarque également que malgré la forte activité protéolytique dont est dotée l'extrait enzymatique brut de Bacillus subtilis , les pertes en rendement sont faibles cela est probablement dû à l'effet du traitement thermique exercé sur le caillé au cours de la cuisson

7. Analyses microbiologiques

Les différentes analyses microbiologiques ont été réalisées conformément aux prescriptions de l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) pour dénombrer les différents germes susceptibles d'altérer le fromage frais au cours de la conservation à 30°C pendant 3 jours.

A. Préparation de la dilution mère :

A chaque prélèvement, une prise d'essai de 10 g de fromage frais a été transférée aseptiquement dans un sachet Stomacher et dilué dans 90 mL d'une solution saline physiologique de peptone (NaCl à 0,85%, peptone à 0,1%). Le mélange a été homogénéisé pendant 60 secondes à l'aide d'un agitateur Stomacher (Seward Laboratory Stomacher 400, Angleterre) pour obtenir la première dilution ($^{10\text{-}1}$) encore appelée dilution mère **(ISO 6887-5 : 2010).**

B . Préparation des dilutions décimales

successives À partir de la dilution mère, des dilutions décimales successives ont été réalisées. La deuxième dilution décimale (10-2) a été obtenue en diluant 1 mL de la dilution mère dans 9 Matériel et Méthodes (**Oluwag bénga Jona Moïse HOUNSOU NCQPA 2018)** 18 mL de la solution saline physiologique de peptone. Les autres dilutions successives ont

été obtenues en diluant à chaque fois 1 mL de la précédente dilution dans 9 mL de solution saline physiologique de peptone et ainsi de suite **(ISO 6887-5:2010).**

C. Dénombrement des germes

Les germes aérobies mésophiles totaux (GAMT) ont été dénombrés avec le milieu de culture gélosé Plate Count Agar (PCA) et ont été incubés à une température de 30°C pendant 72h (NF V08-051). Le dénombrement des bactéries lactiques a été effectué sur des boîtes à double couche de milieu de Man Rogosa et Sharpe (MRS). L'incubation a été effectuée à 30°C pendant 48h (NF 08 – 051). Quant aux levures et les moisissures, elles ont été dénombrées avec le milieu de culture Malt Extract Agar (MEA) + chloramphenicol (100 mg l-1). Le dénombrement des colonies blanches ou colorées, lisses et crémeuses de levures et des moisissures sous forme poudreuse a été effectué après 5 jours d'incubation à 25 °C (ISO 7954). Pseudomonas spp. a été dénombré en surface de la gélose Pseudomonas complétée de Céramide, de Fucidine et de Céphaloridine (CFC) à 25 °C pendant 48h (XP V 08 – 059). Les entérobactéries ont été énumérées sur des boites à double couche de milieu de glucose biliaire rouge violet (VRBG) et incubées à 37°C pendant 24 h **(NF ISO 4831-2006).** Pour les boîtes à double couche, 1 mL de la dilution appropriée a été inoculé dans une boîte de Pétri, puis environ 15 mL du milieu fondu (45°C) ont été versés dans la boîte de Pétri. Après solidification, la boîte de Pétri a été recouverte d'environ 10 mL du même milieu fondu (**Dabadé et al., 2015).**

Le but de ces analyses est de prévenir les altérations microbiennes et de déceler les germes pathogènes, qui nuisent à la qualité hygiénique et marchande du produit et essentiellement de protéger le consommateur des intoxications dangereuses.

Les résultats des analyses bactériologiques du lait sont comparés avec les normes citées par le JO ces résultats donnent le dénombrement des flores qui existent dans les différents échantillons de lait analysés.

Celui-ci permet de comparer les résultats des dénombrements effectués par rapport à des critères microbiologiques établis par le JO relatif aux denrées alimentaire.

Les staphylocoques ;

Selon **(DODD ET BOOTH., 2000),** Staphylococcus aureus est considéré comme une bactérie pathogène majeure, causant des infections mammaires, ces dernières s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité entre le compartiment sanguin et le lait qui a pour conséquence des modifications de la composition du lait **(RANIERI ET BROOK.,2010).**

Sur notre étude on observe une absence de ce germe.

Les salmonelles

Les salmonelles sont la première cause des infections d'origine alimentaire, leur présence dans les produits laitiers pasteurisés peut provoquer de très graves toxi-infections.

Les salmonelles sont absentes dans notre échantillon.

Les coliformes totaux

Les résultats obtenus l'absence totale des coliformes, cela explique la thermo-sensibilité des coliformes.

Donc , notre produit est de qualité microbiologique satisfaisante .

Conclusion

Conclusion

Le fromage est aujourd'hui un des aliments les plus répandus. Il est consommé par toutes les classes de la société, car il réunit des qualités multiples.

Il ya un procédé de fabrication spéciale d'une manière générale, le principe consiste à coaguler le lait puis diviser le caillé pour en séparer le petit lait.

Dans notre étude nous avons choisis une souche identifie comme Bacillus Subtilis cette dernière est isolée localement en proximité de la laiterie Bousken, puis conservé à 4°C sur gélose inclinée en veillant a gardé la vitalité de la souche par un repiquage.

Un milieu semi solide était choisi dans le but d'optimisation du milieu de culture puis l'optimisation de la production.

Lors de l'isolement de la souche on a commencé par sa conservation puis l'activation et un ensemencement sur un milieu GN a était réaliser ainsi qu'une incubation à 30°C pendant 24h.

A travers cette étude, nous avons analysée les paramètres physico-chimiques suivants : pH, acidité, densité, l'extrait sec total et matière grasse. nous avons aussi évalué la contamination globale de cette denrée étudie par plusieurs germes dénombrés : Les Staphylococcus aureus, Clostridium , les Salmonelles, Les Coliformes totaux, La composition des milieux de culture **.**

Les résultats physicochimiques des deux fromages fabriqués comparé avec le fromage issu à partir d'une coagulation par l'extrait floral sont distribuer en fonction de la variation du pH en premier lieu il n' ya pas une différence comparable entre les deux types de fromage par rapport à ce paramètre puis l'acidité et la matière grasse ont montré suite à l'utilisation de l'extrait enzymatique de Bacillus subtilis donne un fromage avec une acidité et une teneur en matière grasse qui sont faible comparables à celles trouvées dans le fromage à base de présure.

Ainsi que le taux de matière grasse du fromage dépend de la composition du lait mis en œuvre, donc la manière de coaguler le lait et de travailler le caillé.

Comme perspectives, les différents fromages issus doivent subir des analyses de la qualités nutritionnels tel que le dosage des sels minéraux, des acides gras et des protéines.

Annexes

Annexe 01 :

Milieu PCA :

- Tryptone 5g
- Glucose 1g
- Extrait de levure 2,5g
- Agar 15g
- MgSO4 0,250g
- Eau distillée QSP 1000ml
- pH = 7.0 ± 0.2 e

Annexe 02 :

Composition Du son utilisé

Origine Moulin ‘Algérie’ Blida

- Humidité: 14. 5 %
- Matières minérales :5.6 %
- Protides (N X 5.7) : 15.7%
- Protides (N X 6.25) : 17.2%
- Lipides : 7.25%
- Amidon : 23.05%
- Acidité (g H2SO4): 0.375
- Sucres réducteurs exprimés en glucose au % de matière sèche : 0.465 %

Annexe 03 : Catalogue de la galerie API 20

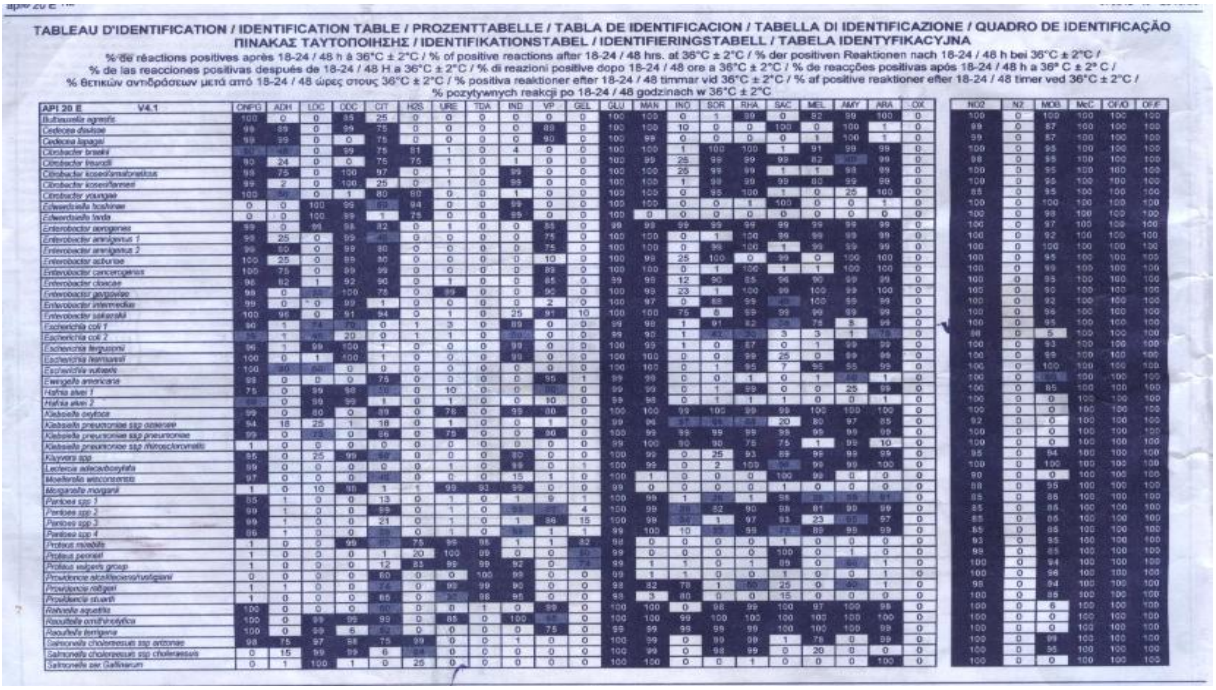
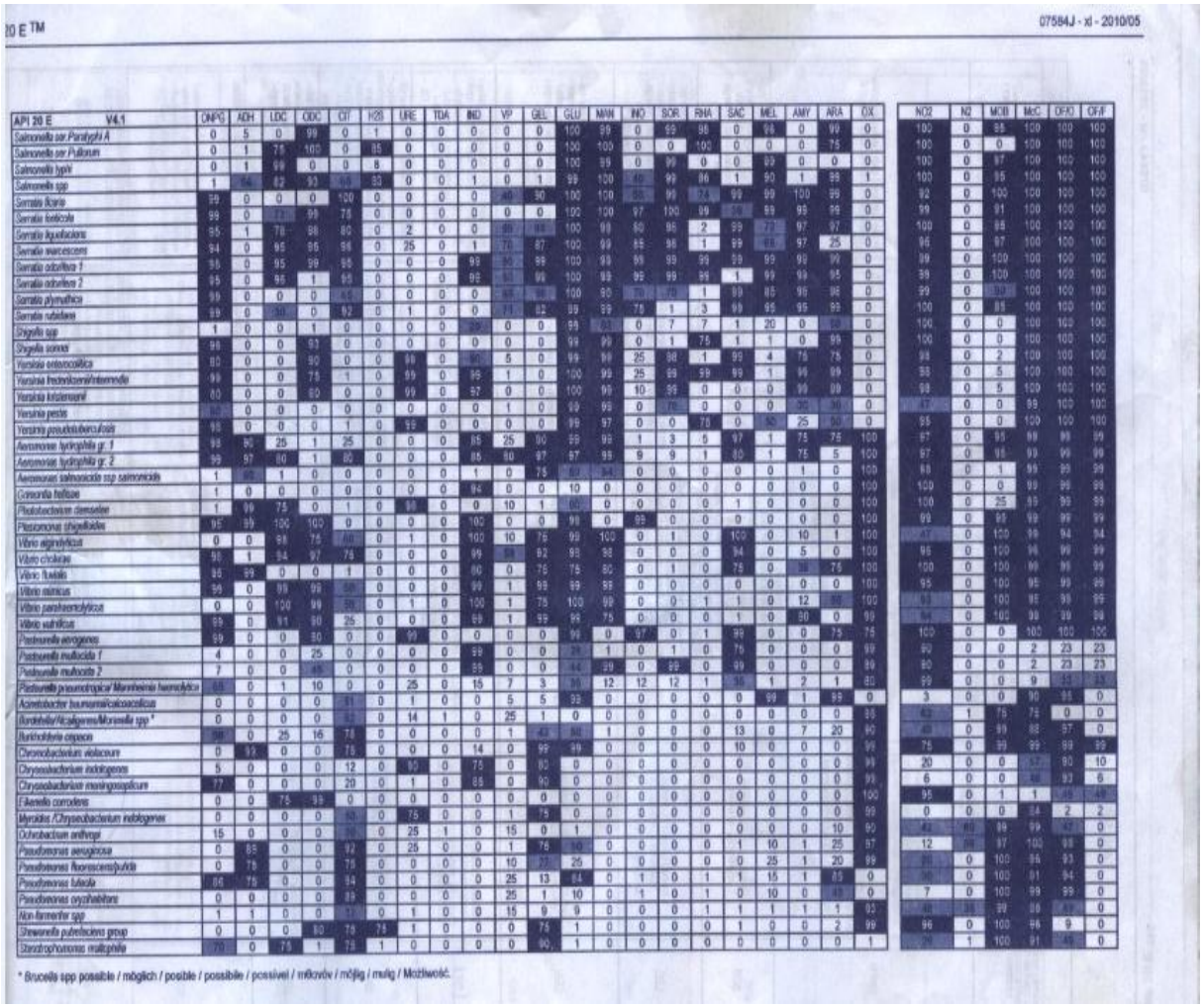


TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE / TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIKATIONSTABEL / IDENTIFIERINGSTABELL / TABELA IDENTYFIKACYJNA

% de réactions positives après 18-24 / 48 h à 36°C ± 2°C / % of positive reactions after 18-24 / 48 hrs. at 36°C ± 2°C / % der positiven Reaktionen nach 18-24 / 48 h bei 36°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 18-24 / 48 H a 36°C ± 2°C / % di reazioni positive dopo 18-24 / 48 ore a 36°C ± 2°C / % de reacções positivas após 18-24 / 48 h a 36° C ± 2° C / % θετικών αντιδράσεων μετά από 18-24 / 48 ώρες στους 36°C ± 2°C / % positiva reaktioner efter 18-24 / 48 timmar vid 36°C ± 2°C / % af positive reaktioner efter 18-24 / 48 timer ved 36°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 18-24 / 48 godzinach w 36°C ± 2°C

API 20 E V4.1	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
Bulkholderia agreris	100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	20	0	83	99	100	0
Cedecea davisae	99	99	0	99	75	0	0	0	0	80	0	100	100	10	0	0	100	0	100	1	0
Cedecea lapagei	98	99	0	0	75	0	0	0	0	90	0	100	99	0	0	0	0	1	100	1	0
Citrobacter braaki	90	98	0	99	75	81	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99	0
Citrobacter freundi	80	24	0	0	75	75	1	0	1	0	0	100	99	25	99	99	99	82	100	99	0
Citrobacter koseiformetrokus	98	75	6	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	26	99	99	1	81	98	99	0
Citrobacter koseriflamed	99	97	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	99	80	99	99	0
Citrobacter youngae	100	50	0	1	80	80	0	0	1	0	0	100	100	0	95	100	1	0	25	100	0
Edwardsiella hoshinae	0	0	100	99	99	94	0	0	99	0	0	100	100	0	0	1	100	0	0	1	0
Edwardsiella tarda	0	0	100	99	1	75	0	0	99	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enterobacter aerogenes	99	0	99	99	82	0	1	0	0	99	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0
Enterobacter amnigenus 1	99	25	0	99	97	0	0	0	0	75	0	100	100	0	1	100	99	99	99	99	0
Enterobacter amnigenus 2	99	50	0	99	80	0	0	0	0	75	0	100	100	0	99	100	1	99	99	99	0
Enterobacter asburiae	100	25	0	99	80	0	0	0	0	10	0	100	99	25	100	0	99	0	100	100	0
Enterobacter cancerogenus	100	75	0	99	99	0	0	0	0	99	0	100	100	0	1	100	1	1	100	100	0
Enterobacter cloacae	96	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	12	90	85	96	90	99	99	0
Enterobacter gergoviae	99	0	1	100	75	0	99	0	0	90	0	100	99	23	1	100	99	100	99	100	0
Enterobacter intermedius	99	0	0	99	1	0	0	0	0	2	0	100	97	0	85	95	0	100	99	99	0
Enterobacter sakazakii	100	95	0	91	94	0	1	0	25	91	10	100	100	75	8	99	99	99	99	99	0
Escherichia coli 1	90	1	94	75	0	1	3	0	99	0	0	99	99	1	91	82	0	75	5	99	0
Escherichia coli 2	97	1	94	20	0	1	1	0	97	0	0	99	99	1	0	94	3	3	1	93	0
Escherichia fergusonii	96	1	99	100	1	0	0	0	99	0	0	100	99	1	0	87	0	1	99	99	0
Escherichia hermanii	100	0	1	100	1	0	0	0	99	0	0	100	100	0	9	99	25	0	89	99	0
Escherichia vulneris	100	50	99	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	93	55	99	0
Ewingella americana	99	0	0	0	75	0	0	0	0	95	1	99	99	0	0	1	0	1	93	1	0
Hafnia alvei 1	75	0	99	98	50	0	10	0	0	80	0	99	99	0	1	99	0	0	25	99	0
Hafnia alvei 2	98	0	99	99	1	0	1	0	0	10	0	99	98	0	1	1	1	0	0	1	0
Klebsiella oxytoca	99	0	80	0	89	0	75	0	99	80	0	100	100	99	100	99	99	100	100	100	0
Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae	94	18	25	1	18	0	1	0	0	1	0	99	96	1	85	97	20	80	97	95	0
Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	99	0	98	0	89	0	75	0	0	90	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0
Klebsiella pneumoniae ssp rhinoscleromatis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	90	90	75	75	1	99	10	0
Kluyvera spp	85	0	25	99	97	0	0	0	80	0	0	100	99	0	25	93	89	99	99	99	0
Leclercia adecarboxylata	99	0	0	0	0	0	1	0	99	0	1	100	99	0	2	100	0	99	99	100	0
Moellerella wisconsensis	97	0	0	0	100	0	0	0	15	1	0	100	1	0	0	0	100	99	0	0	0
Morganella morganii	1	0	10	98	1	1	99	93	99	0	0	99	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Pantoea spp 1	85	1	0	0	13	0	1	0	1	9	1	100	99	1	25	1	98	81	85	99	0
Pantoea spp 2	99	1	0	0	89	0	1	0	1	0	4	100	99	1	82	90	98	81	99	99	0
Pantoea spp 3	99	1	0	0	21	0	1	0	1	98	16	100	99	99	1	97	93	23	100	97	0
Pantoea spp 4	99	1	0	0	89	0	1	0	99	1	1	99	100	10	1	99	75	89	99	99	0
Proteus mirabilis	1	0	0	99	99	75	99	95	1	1	82	99	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Proteus penneri	1	0	0	0	1	20	100	99	0	0	50	99	0	0	0	0	100	0	1	0	0
Proteus vulgaris group	1	0	0	0	12	83	95	99	92	0	7	99	1	1	0	1	99	0	96	1	0
Providence alcalifaciens/rustigianii	0	0	0	0	10	0	0	100	99	0	0	99	1	1	0	1	0	1	0	1	0
Providencia rettgeri	1	1	0	0	82	0	99	99	90	0	0	99	82	78	1	80	25	0	20	1	0
Providencia stuartii	1	0	0	0	85	0	2	98	95	0	0	99	3	80	0	0	15	0	0	0	0
Rahnella aquatilis	100	0	0	0	50	0	0	1	0	99	0	100	100	0	98	99	100	97	100	99	0
Raoultella ornithinolytica	100	0	99	99	99	0	85	0	100	0	0	100	100	99	100	100	100	100	100	100	0
Raoultella terrigena	100	0	99	5	75	0	0	0	0	75	0	99	99	99	99	99	100	100	100	99	0
Salmonella choleraesuis ssp arizonae	98	75	97	58	75	99	0	0	1	0	0	100	99	0	99	99	1	75	0	99	0
Salmonella choleraesuis ssp choleraesuis	0	15	99	99	6	94	0	0	0	0	0	100	99	0	98	99	0	20	0	0	0
Salmonella ser Gallinarum	0	1	100	1	0	25	0	0	0	0	0	100	100	0	0	1	0	0	0	100	0

NO2	NZ	MOB	MeC	OF/O	OF/F
100	0	100	100	100	100
99	0	87	100	100	100
99	0	87	100	100	100
100	0	95	100	100	100
98	0	95	100	100	100
100	0	95	100	100	100
100	0	95	100	100	100
85	0	95	100	100	100
100	0	100	100	100	100
100	0	99	100	100	100
100	0	97	100	100	100
100	0	92	100	100	100
100	0	95	100	100	100
100	0	99	100	100	100
100	0	95	100	100	100
100	0	90	100	100	100
100	0	92	100	100	100
100	0	99	100	100	100
100	0	95	100	100	100
98	0	5	100	100	100
100	0	93	100	100	100
100	0	99	100	100	100
100	0	100	100	100	100
100	0	95	100	100	100
100	0	0	100	100	100
92	0	0	100	100	100
100	0	0	100	100	100
100	0	0	100	100	100
95	0	84	100	100	100
100	0	100	100	100	100
90	0	0	100	100	100
88	0	95	100	100	100
85	0	86	100	100	100
85	0	86	100	100	100
85	0	86	100	100	100
85	0	86	100	100	100
93	0	95	100	100	100
99	0	85	100	100	100
100	0	94	100	100	100
100	0	98	100	100	100
95	0	84	100	100	100
100	0	86	100	100	100
100	0	6	100	100	100
100	0	0	100	100	100
100	0	0	100	100	100
100	0	99	100	100	100
100	0	95	100	100	100
100	0	0	100	100	100



Annexe 03 :

Le lien de galerie API 50

https://www.lustiner.com/Articles/4842494/Galerie-API-50-CH-p-etude-metabolisme-des-hydrates-de-carbone-de-microorganismes-/search%5Bpos%5D=40&search%5Btags%5D=298

Annexe 04 :



PH métre .

Référence bibliographique

A.F.N.O.R., 1993. Recueil de normes françaises. Contrôle de la qualité de produits alimentaires: Laits et produits laitiers. Analyses physicochimiques. (4ème ed.). Paris, 562p.

ABOUTAYEB R., 2009. Technologie du lait et dérivés laitiers.

Arima K., Yu J., Iwasaki S., 1970. Milk clotting enzyme from Mucor pusillus var. Lin dt. In: Perlmann G, Lorand L, editors. Methods in Enzymology,New York,19, p. 446–59.

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

Amiot J., Paul A., Laurent B., Jean-Luk B., Britt, Michel, Castaigne and François. 2002. 'Science et technologie du lait, transformation du lait, 2eme Edition. Fondation de technologies laitières inc, Ecole polytechnique de Montréal'. p 600.

Berridge. N.J., 1952. Determination of the activity of rennet.Analyst.77:57-62

Badgujar S.B., Mahajan R.T., 2014. Nivulian-II a new milk clotting cysteine protease of Euphorbia nivulia latex, International Journal of Biology and Macromolecular, (70) p.p. 391–398.

BOUREGOISE. CM et LARPENT. (1989) : Microbiologie alimentaire. Tome 2 .Pp. 31, 34.

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

CODEX alimentarus. (1996) : Programme mixte FAO/ OMS sur les normes alimentaire et l'agriculture Organisation Mondiale de la santé. 2eme édition.

CAROLE L.V., (2002). Science et technologie du lait : transformation du lait. Fondation et technologie laitier du Québec. P : 29-407.

DODD F. H ET BOOTH J . (2000). Mastitis an milk production. dans the healthy of dairy cattle.
Edition Anrews A.H , London, pp 21 3-255.

Davet P et Rouxel F., 1997.Techniques for direct isolation of microorganisms from soil. Collection Techniques et pratiques. INRA Editions (Rennes, France).
Dechema, sichercheit in biotechnology. In: Biotechnologies. Cood. Scriban., R. 4emeèd. 357-

ECK., (1990). Le Fromage 3eme Edition, Techniques et Documentation, Lavoisier.

ECK A. (1987). Le fromage. Technique documentation. 2'éme Ed .Lavoisier. Paris. P : 13, 17, 137,138. 529.

EVETTE., (1975). La fromagerie.- Paris : Presses universitaires de France, 140 p.

FREDOT., (2005). Connaissance des aliments - bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Edition Tec & Doc, Lavoisier, pp 38,43/424.

FAVIER J. C., (1985). Composition du lait de vache-Laits de consommation, http://www.horizon.documentation.fr

F.A.O. 2014. Données statistique sur l'élevage.

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

Grisvard P. and Chaudun V., 1964. Le bon jardinier 2, encyclopédie horticole, la maison rustique, Paris, 1667p

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

Heimgartner U., Pietrzak M., Geertsen R., Brodelius P., Dasilva figueiredo A.C., Pais M.S.S.1990. Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of Cynara cardunculus. Phytochemistry 29 :1405–1410.

HODEN P., et COULON H., (1991).Composition chimique du lait, http:// www.2.vet.lyon.fr.

ISO 6887-5:2010. Microbiologie des aliments -- Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique -- Partie 5: Règles spécifiques pour la préparation du lait et des produits laitiers.

JEANTET, CROGUENNE, MAHAUT, SCHUCK et BRULE., (2008). Les produits laitiers ,2ème édition, Tec et Doc, Lavoisier: 1-3-13-14-17 (185 pages).

JUILLARD et RICHARD., (1996). Le lait, P 24 – 26.

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

Kramer A., 1960. A quick, rank test for significance of difference in multiple comparisons food . technology, 10(8), p.p.391-392.

LENOIR, LAMBERT et SCHMIODT., (1983). L'élaboration d'un fromage l'exemple du Camembert. Pour la Science, 69, 30-42.

Larousse A. 2002.Science et technologie du lait :transformation du lait. p. 767. Available at: https://books.google.com/books?id=E-rb_Pff15sC&pgis=1.

Llorente .B.E., Brutti. C.B and Caffini .N.O. 2004. Purification and characterization of a milkclotting aspartic proteinase from globe artichoke (Cynara scolymus L). J. Agric. Food Chem., 52: 8182–8198.

LIBOUGA D.G., VERCAIGNE-MARKO D., DJANGAL S. L., I. CHOUKAMBOU, EBANGI A.L., M. OMBIONYO, BEKA R.G., ABOUBAKAR T.M., GUILLOCHON D., 2006. Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de Balanites aegyptiaca. Tropicultura, 24, pp : 229-238.

Llorente .B.E., Brutti. C.B and Caffini .N.O. 2004. Purification and characterization of a milkclotting aspartic proteinase from globe artichoke (Cynara scolymus L). J. Agric. Food Chem., 52: 8182–8198.

LAWRENCE RC, CREAMER LK et GILLES., (1987). Texture development during cheese ripening. J Dairy Sci 70: 1748-1760.

LEMIEUX et SIMARD R.D., (1994). Bitter flavour in Dairy Products. Lait, 72, 335-382.

MIETTON. (1986). La préparation des laits de fromage en technologie pâte molle. Industrie alimentaire et agricole .

Merheb-Dini C., Gomes E., Boscolo M., Da Silva R., 2010. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated Thermomucor indicaeseudaticae N31. Food Chemistry, 120, p.p.87-93.

Mahaut M, Jeantet R, Brule G. (2000). Initiation à la technologie fromagère : Technique et documentation

MAHAUT M., JEANTET R., SCHAK P. BRUL G. (2000). Les produits laitiers. Ed. Tec et Doc, Lavoisier. Paris. P: 26-180.

MEYER C., DUTEURTREG. (1998). Equivalent lait et rendement en produit laitières : modes de calculs et utilisation. P : 247-257.

MAUBOIS J.L., RICORDEAU G., MOCQUOT G (1970). Etude des rendements en fromagerie de Camembert et de Saint-Paulin. Lait 50. P : 351-373.

MITTAINE J., (1980).Les laits autres que le lait de vache .

MIETTON., (1995). Incidence de la composition des fromages au démoulage et des paramètres d'environnement sur l'activité des agents de l'affinage. Revue des ENIL, 189, 19- 27.

MICHEL Mahant, ROMMAIN Jeant et GERART Brulé., (2000). Initiation à la technologie fromagère. 2° Edition Technique et documents. 224pages.

NEELAKANTEN, SHAHANI et ARNOLD., (1971). Lipases and flavor development in some Italian cheese varieties. Food Production Development, 5, 52-58.

Paris RAMET., (1985). La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéens. Ed. Etude FAO. Production et santé animale, 187 P.

POUGHEON S .et GOURSAUD J., (2001). Le lait caractéristiques physicochimiques In DEBRY G., Lait, nutrition et santé, Tec et Doc.

POUGHEON., (2001). Contribution a l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière, Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse, France: 34 (102 pages).

Production of industrial enzymes at novo nordisk based upon genetically microorganisms.
Raynal-Ljutovac K., Lagriffoul G., Paccard P., Guillet I., Ghilliard Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. Small ruminant Research,79 :57-72.

Roseiro l B., Barbosa M., Ames j.M. and Wilbey R.A. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants-the use of Cynara L. for the production of ovine milk cheeses. Int. J. Dairy Tech., 56:76–85.

RANIERI, M.L. , et BOOR, K.J., 2010. Tracking and eliminating sporeformers in dairy systems. Australian Journal of Dairy Technology, 65:74-80.

Ramet, J.P, 1985 : fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnel Algérien « Bouhezza »

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

RAMET., (1987). La préparation du caillée, 1- : La présure et les enzymes coagulantes. Dans le fromage, Tec et Doc. Lavoisier, pp 101-107, 539

Schiff H.E., 1992. Environmental production and safety measures Related to biotechnological

STILES et Holzapfel., (1997). Review article Lactic acid bacteria of foods And their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36: 1-29p

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), p.p. 85-91.

SPINNILER et GRIPON., (2004). Surface Mould-Ripened Cheeses. In: Fox PF, McSweeney PL, Cogan TM, Guinee TP, editors. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 3rd ed. pp. 157-174.

Talantikite K. S., 2015. Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie. Thèse de doctorat, technologie alimentaire, Université M'hamed Bouguara Boumerdès, 167p.

VIGNOLA., (2002). Science et technologie du lait –Transformation du lait, École polytechnique de Montréal, ISBN: 29-34 (600 pages).

VEISSEYRE R. (1975) : Technologie du lait. Constitution, récolte, traitement et transformation du lait 2'éme Ed. La maison Rustique. Paris. P : 461-692. 63.

VEISSEYRE R., (1975). Technologie du lait : Constitution, Récolte, Traitement et Transformation du lait, 3émeédition. Rustique. P1. P3