RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université de Médéa

Faculté des sciences

Département de Biologie et Ecologie

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

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

Spécialité : ***Microbiologie Appliquée***

Thème :

Extraction et caractérisation biochimiques des enzymes coagulant le lait d'origine microbienne et animale. Essai de fabrication d'un fromage à base de lait de chèvre

Présentée par :
- MIHOUBI Maroua

- ZAOUI Lamia

Soutenue publiquement le …… devant le jury :

Nom et prénom	*Grade*	*Statut*	*Établissement*
Mme **KADI .A**	MAA	Présidente	Université de Médéa
Mme **HOSSEINI .A**	MAB	Examinatrice	Université de Médéa
Mme **BOUMEDIENE.F**	MCB	Promotrice	Université de Médéa

Année universitaire : 2024/2025

Remerciements

Avant toute chose, je rends grâce à ***"Allah "****, le Tout-Puissant, qui m'a accordé la force, la volonté et la patience nécessaires pour mener à bien ce modeste travail.*

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon encadreuse, ***Madame Dr. BOUMEDIENE Farida,*** *pour son accompagnement précieux, ses conseils avisés, sa rigueur scientifique et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

J'adresse également mes remerciements au président du jury, pour l'honneur qu'il m'a fait en présidant ma soutenance, ainsi qu'à tous les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Ma reconnaissance va aussi à ***Monsieur Boulal Mohamed, responsable de la recherche et développement à la laiterie Arib (Wilaya de Aïn Defla)****, pour son accueil chaleureux, son soutien et les informations précieuses qu'il m'a fournies.*

Je remercie ***l'équipe du laboratoire*** *dans son ensemble pour leur aide, leur disponibilité et leur appui technique, qui ont grandement facilité la mise en œuvre des travaux pratiques.*

Un remerciement tout particulier à ***Mademoiselle Naïma****, étudiante en biochimie, pour son aide généreuse et son soutien durant ce travail. Sa collaboration a été d'une grande valeur pour moi.*

Enfin, j*'exprime ma reconnaissance à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation durant ces cinq années, ainsi qu'à toutes les personnes qui m'ont soutenue, de près ou de loin, dans la réalisation de ce mémoire.*

Dédicace

Avant tout, toute ma gratitude va à Dieu,

Le Tout-Puissant, Le Sage,

Lui qui m'a accordé la force dans la faiblesse,

la lumière dans le doute, et la patience dans l'épreuve.

Sans Sa grâce et Sa miséricorde, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

***Je dédie ensuite ce travail à moi-même**,*

à celle qui a douté, qui est tombée, mais qui s'est relevée à chaque fois,

à celle qui a cru en ses rêves malgré les obstacles.

À ma famille,

à mes parents bien-aimés pour leur amour infini et leurs prières silencieuses,

à mes frères et sœurs pour leur présence réconfortante,

et à tous ceux qui ont cru en moi, même lorsque moi-même, j'en doutais.

À mes amies et amis,

Pour leurs mots d'encouragement, leur soutien constant,

et les instants partagés entre fatigue, stress et éclats de rire.

***À mes enseignantes, enseignants et encadrants**,*

Pour leur accompagnement, leurs conseils éclairés,

et leur exigence bienveillante qui m'a poussée à donner le meilleur de moi-même.

Que ce travail soit un modeste témoignage de reconnaissance

à toutes celles et ceux qui ont contribué, de près ou de loin,

à ce chemin vers l'accomplissement

Maroua

Dédicace

Je dédie ce travail, avec tout mon amour et ma reconnaissance :

A mon père bien-aime Abderrahmane,

Pour sa force, ses sacrifices silencieux et son soutien indéfectible. Que Dieu te protège et t'accorde une longue vie.

A ma chère mère Fatima Zahra,

Toi qui as toujours été la, avec ton amour inconditionnel, ta patience et tes prières. Ce travail est le fruit de ton courage et de ta tendresse.

A mon frère Issam,

Pour sa présence rassurante, son écoute et ses encouragements constants.

A mes sœurs Souad et Hadil,

Vous êtes mes complices, mes fiertés. Merci pour votre affection et votre lumière au quotidien.

***A mes tantes Fatiha et Malika**,*

Pour leur gentillesse, leur soutien discret et leur amour familial.

Et enfin, A tous mes ami(e)s,

Pour leurs sourires, leurs mots sincères et les beaux souvenirs partages.

Avec tout mon cœur

Lamia

Résumé :.....
...

Résumé

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation biotechnologique des enzymes coagulantes d'origines alternatives, en réponse à la limitation croissante de la présure animale traditionnelle.

L'objectif principal est l'extraction, la purification partielle et la caractérisation biochimique comparative d'enzymes coagulantes issues de deux origines distinctes : une souche bactérienne appartenant au genre Bacillus (*Bacillus sp*), productrice d'enzymes protéolytiques extracellulaires, et un extrait enzymatique gastrique issu de la caillette caprine. La souche microbienne a été isolée à partir d'un échantillon environnemental, identifiée sur la base de caractéristiques morphologiques, biochimiques et génétiques, puis cultivée en conditions optimales pour la production d'enzymes extracellulaires. L'évaluation de certaines caractéristiques des protéases a révélé des activités coagulantes faibles ; des activités protéolytiques élevés et des indices AC/AP (activité coagulante / activité protéolytique) faibles pour les protéases d'origine microbienne (127.18)et animale(0.520UP/ml). Des essais de fabrication de fromage frais à base de lait caprin ont été réalisés en utilisant les extraits enzymatiques bruts d'origine animale et microbienne et la présure commerciale. Les rendements de coagulation (EEBc « 12.70 » ; EEBm « 12.29 » ;EEBa « 9.85 », les propriétés physico-chimiques (pH, taux d'humidité, texture) ainsi que les qualités organoleptiques des fromages obtenus ont été comparés. L'évaluation sensorielle des fromages a révélé une texture et un goût satisfaisants pour chaque fromage. Cependant, l'odeur du fromage fait à partir de l'EEBa (extrait enzymatique brut animale) est plus appréciée en comparaison avec les autres fromages.

Mots clés : souche bactérienne; présure ; fromage ; protéase ; la caillette caprine.

Abstract :.....

Abstract :

This study is part of the biotechnological valorization of coagulating enzymes from alternative sources, in response to the growing limitation of traditional animal rennet.

The main objective is the extraction, partial purification, and comparative biochemical characterization of coagulating enzymes from two distinct sources: a bacterial strain belonging to the genus Bacillus (Bacillus sp.), which produces extracellular proteolytic enzymes, and a gastric enzyme extract from goat abomasum. The microbial strain was isolated from an environmental sample, identified based on morphological, biochemical, and genetic characteristics, and then cultivated under optimal conditions for the production of extracellular enzymes. Evaluation of certain protease characteristics revealed low coagulating activities ; high proteolytic activities and low AC/AP indices (coagulant activity/proteolytic activity) for proteases of microbial (127.18) and animal (0.520UP/ml) origin. Trials of fresh cheese production from goat milk were carried out using crude enzymatic extracts of animal and microbial origin and commercial rennet. The coagulation yields (EEBc “12.70”; EEBm “12.29”; EEBa “9.85”, the physicochemical properties (pH, humidity level, texture) as well as the organoleptic qualities of the cheeses obtained were compared. The sensory evaluation of the cheeses revealed a satisfactory texture and taste for each cheese. However, the smell of the cheese made from EEBa (raw animal enzyme extract) is more appreciated in comparison with the other cheeses.

Keywords: bacterial strain; rennet; cheese; protease; goat abomasum.

تلخيص:.....

تلخيص:

هذه الدراسة جزء من التقييم البيوتكنولوجي لإنزيمات التخثر من مصادر بديلة، استجابةً للقيود المتزايدة على المنفحة الحيوانية التقليدية. الهدف الرئيسي هو استخلاص إنزيمات التخثر، وتنقيتها جزئيًا، وتوصيفها كيميائيًا حيويًا مقارنًا من ، والتي تنتج إنزيمات بروتينية خارج الخلية، (*Bacillus sp*) مصدرين مختلفين: سلالة بكتيرية تنتمي إلى جنس العصوية ومستخلص إنزيم معدي من منفحة الماعز. عُزلت السلالة الميكروبية من عينة بيئية، وحُددت بناءً على خصائصها المورفولوجية والكيميائية الحيوية والوراثية، ثم زُرعت في ظروف مثالية لإنتاج إنزيمات خارج الخلية. كشف تقييم بعض (نشاط AC/AP خصائص البروتياز عن انخفاض أنشطة التخثر؛ وارتفاع أنشطة البروتين؛ وانخفاض مؤشرات (التخثر/النشاط البروتيني) لكل من البروتياز الميكروبي127.18 والحيواني0.520. أُجريت تجارب لإنتاج الجبن الطازج من حليب الماعز باستخدام مستخلصات إنزيمية خام من أصل حيواني وميكروبي ومنفحة تجارية. قورنت نتائج التخثر البروتياز الحيواني 9.85 البروتياز الميكروبي 12.29البروتياز المصنعي 12.70، والخصائص الفيزيائية والكيميائية (الرقم الهيدروجيني، ومستوى الرطوبة، والملمس)، بالإضافة إلى الخصائص الحسية للأجبان الناتجة. أظهر التقييم الحسي (مستخلص إنزيمي حيواني خام) أكثر EEBa للأجبان قوامًا وطعمًا مُرضيين. ومع ذلك، تُعتبر رائحة الجبن المصنوع من تميزًا مقارنةً بأنواع الجبن الأخرى.

الكلمات المفتاحية: سلالة بكتيرية، المنفحة، الجبن، البروتياز، معدة الماعز.

Listes d'abréviations :

AC : Activité coagulante.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AP : Activité protéolytique.

APs : Protéase aspartiques.

B.S.A : Sérum albumine bovine.

CCS : Comptage des cellules somatiques.

CFU/ml : Unité formatrice de colonie par millilitre.

DLC : Date limite de consommation.

DO : Densité optique.

EEB : Extrait enzymatique brut.

EEBm : Extrait enzymatique brut microbien.

EEBa : Extrait enzymatique brut animale

EEBc : Extrait enzymatique brut commerciale

ESD : Extrait sec dégraissé.

EST : Extrait sec totale.

Fm : Fromage d'origine microbien.

Fc : Fromage d'origine présure commerciale

Fa : Fromage d'origine animal

GN : Gélose nutritive.

J.O: Journal official.

KDa: Kilodalton.

M : Mole.

MG : Matière grasse.

mg/ml : milligramme par millilitre.

Listes d'abréviations.....

MS : Moyenne des scores.

Listes d'abréviations.....

N : Normalité.

nm : Nanomètre.

P/V : Poids/volume.

PCA: Plate Count Agar.

Pds : Poids.

R2 : Coefficient de corrélation.

Rdt : Rendement fromager.

SR : Sommes des rangs.

TCA : Acide trichloracétique.

trs/min : Tours/minute.

UP : Unité de Présure.

US : Unité Soxhlet.

UV : Ultra -violet.

Listes des tableau

Tableau 1 :techniques d'extraction des différents coagulants 11

Tableau 2 :Composition comparée des laits de vache et de chèvre. (Monsieur le Docteur Jean-Denis BAILLY., 2005 16

Tableau 3 : Absorbance des différents MC Farland standard à 600 nm 26

Tableau 4 : observation macroscopique et microscopique 53

Tableau 5 :identification de la souche 55

Tableau 6 : Activité coagulante de l'extrait enzymatique brut 56

Tableau 7 : Comparaison de l'AC de l EEB aux autres AC des coagulases 57

Tableau 8 : activité protéolytique 58

Tableau 9 : rapport AC/AP 58

Tableau 10 : caractéristique de l'extrait enzymatique 59

Tableau 11 : les paramètres physicochimique de lait de caprin 65

Tableau 12 : a composition physicochimique des trois fromages élaborés 66

Tableau 13 : résultats des analyses microbiologies de lait pasteurisé 67

Tableau 14 : résultat des analyses microbiologiques du produit fini 68

Tableau 15 : récapitulatif des résultats de test de dégustations obtenus sur les fromages élaboré 68

Listes des Figures.....

Figure 1 :Fromage à pâte persillé (journal des femmes cuisines) 21

Figure 2 : Fromage à pâte molle type Camembert (Farhat, 2017) 21

Figure 3 :(A) Prélèvement de sol (B) préparation de milieu de culture (C) antifongique 24

Figure 4 : Revivification de la souche 26

Figure 5 : fermentation semi-solide 28

Figure 6 : Protocole d'obtention de l'extrait enzymatique brut produit par la souche isolée 29

Figure 7 : Caillette caprine 30

Figure 8 : Protocole d'extraction de la présure caprine 31

Figure 9 : les étapes d'extraction du la présure caprine 32

Figure 10 :Protocole de l'activité coagulante 34

Figure 11 :les étapes de fabrication du fromage 41

Figure 12 : Etapes générales de fabrication de fromage frais 42

Figure 13 : dégradation de caséine 53

Figure 14 : observation microscopique de la souche isolée (Photo originale, 2025) 54

Figure 15 : teste catalase (photo originale 2025) 54

Figure 16 : teste oxydase (photo originale2025) 55

Figure 17 : extrait enzymatique brut microbienne 56

Figure 18 : influence du pH du lait sur l'activité coagulante relative de l'extrait enzymatique microbien et animal 61

Figure 19 : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante relative de l'extrait enzymatique microbien et animal 62

Figure 20 : Influence de la concentration en CaCl2 du lait sur l'activité coagulante relative de l'extrait enzymatique microbien et animal 63

Figure 21 : influence de la concentration en enzyme du lait sur l'activité coagulante relative de l'extrait enzymatique microbien et animal 64

Figure 22 :Histogramme d'analyse statistique du paramètre sensoriel 69

Figure 23 :Histogramme des résultats des analyses d'odeur des fromages fabriqués 70

Listes des Figures.....

Figure 24 :Histogramme des résultats des analyses du texture des fromages fabriqués 71

Table des matières.....

Table des matières :

Introduction 1

Chapitre I synthèse bibliographique..... ..3

1. Présure..... 3

1.1. Historique sur la présure ……..... 3

1.2. 1.2. Enzymes coagulantes……...3

2. Les composants de la présure..... 4

2.1. La chymosine..... 4

2.2.pepsine ……...5

3. Autres enzymes coagulant le lait..... 5

3.1. Les enzymes coagulantes d'origine animale..... .6

3.2. Les enzymes coagulantes d'origine végétale 7

3.3. Les enzymes coagulantes d'origine microbienne 7

3.3.1.enzymes d'origine fongique..... 8

3.3.2.enzymes d'origine bactérienne…… 9

4.extraction de présure……9

5. Genre bacillus..... 10

6.les mécanismes de la coagulation par la présure ……..11

6.1.phase primaire ……..... 11

6.2.phase secondaire ……..12

6.3.phase tertiaire ……..12

7. Fromage 13

7.1. Définition..... 13

7.2.historique…….....13

7.3. Composition du fromage 14

7.4. Fabrication de fromage..... 15

7.4.1.coagulation du lait 16

- ❖ Coagulation acide ……..16
- ❖ Coagulation enzymatique..... ...16
- ❖ Coagulation mixte 17

7.4.2.égouttage..... 17

Table des matières.....

7.4.3.salage 17
7.4.4.affinage..... 18
8. Types de fromages 18
8.1 fromage frais..... 18
8.2. Fromage à pâte pressée 18
A .fromages à pâte pressé non cuit..... 19
B.fromages à pâte pressé cuite 19
8.3.fromage à pâte persillée.....19
8.4.fromage fondus.....19
8.5. Fromage à pâte molle 20
A.fromage de pâte molle à croûte fleurie 20
B.fromage de pâte molle à croûte lavée 20
Chapitre II matériels et méthodes..... 21
Objectifs de travail.....21
Lieu et période de travail.....21
I. Matériel biologique 21
1. Origine de la souche.....21
2. Méthode d'isolement de la souche..... 21
❖ Test biochimique.....22
Test catalase.....22
Test oxydase.....23
3. Obtention de l'extrait enzymatique..... 23
❖ Révivication de la souche..... 23
❖ Préparation de l'inoculum..... 24
4. Préparation et inoculation du milieu de culture 24
4.1. Méthode de préparation et d'inoculation du milieu de culture..... 25
4.2. Conditions de fermentation 25
5. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut microbien (EEBm) 26
5.1. Extraction de l'enzyme coagulante..... 26
II. Matériel animal..... 27
1. Matière biologique utilisé..... 27
2. Obtention et prétraitement animal..... 28

Table des matières.....

3. Mesure des activités enzymatiques (microbienne et animale) 29
- ❖ Mesure de l'activité coagulante (AC) 32
- ❖ Temps de coagulation 32
- ❖ Force coagulante 32
- ❖ Mesure de l'activité protéolytique..... 33
- ❖ Détermination de l'indice AC/AP..... 33
- ❖ Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique.....34

4. Caractéristiques de l'extrait enzymatique..... 34
- Influence de la température 34
- Influence du pH..... 34
- Influence de la concentration en $CaCl_2$ 34
- Influence de la concentration en enzyme.....35

II. Essai de fabrication du fromage frais par l'utilisation de l'EEB (microbien et animal)..... 35

1. Introduction.....35
2. Analyses physico-chimiques de lait.....35

2.1. Objectif..... 35
2.2. Méthodes.....35
2.2.1. Détermination de l'acidité titrable.....35
2.2.2. Détermination de la teneur en matière grasse.....36
2.2.3. Détermination de la densité.....36
2.2.4. Détermination de l'extrait sec totale (la matière sèche totale).....37
2.2.5. Détermination de l'extrait sec dégraissé.....37
2.2.6. Détermination du pH.....37
2.2.7. Détermination de la température.....38

3. Préparation de fromage frais.....38

3.1. Procédé de fabrication.....38
3.2. Fabrication de fromage.....39
3.3. Étape de fabrication de fromage.....39
3.3.1. Pasteurisation du lait.....39
3.3.2. Ensemencement.....39
3.3.3. Emprésurage..... 39

Table des matières.....

3.3.4. Coagulation 39
3.3.5. Découpage du caillé.....39
3.3.6. Égouttage..... 39
3.3.7. Moulage..... 39
3.3.8. Conservation.....40
4. Analyses physico-chimiques du fromage 42
4.1.mesure de pH 42
4.2.détermination de l'acidité..... 42
4.3.extrait sec total du fromage 42
4.4.matière grasse 42
4.5.extrait sec dégraissé (ESD).....43
4.6.rendement fromager..... 43
5. Analyse microbiologique du fromage..... 44
5.1. Objectif..... 44
Chapitre III résultats et discussions..... 47
I. Identification de la souche..... 47
1. Étude macro et microscopique 47
3. Teste catalase..... 48
4. Teste oxydase 48
I. Résultats de l'extraction de l'extrait enzymatique d'origine microbienne 48
1. Production d'enzyme coagulant le lait 48
A. Conditions de fermentation 48
2. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut..... 49
2.1. Caractère apparent de l'extrait enzymatique.....49
2.2. Activité coagulante de l'EEB 49
2.2. Activité protéolytique, indice AC/AP et teneur en protéine de l'EEB 50
- Activité protéolytique et indice AC/AP microbienne.....50
- Détermination de rapport AC/AP.....51

Table des matières.....

II. Résultats de l'extraction enzymatique de l'extrait d'origine animale(EEBa) 52
1. Activité coagulante de l'EEBa 52
2. La force coagulante.....52
3. Activité protéolytique de l'EEBa 52
4. Détermination du rapport AC/AP..... 53
Dosage des protéines de l'extrait enzymatique.....53
5. Conditions optimales de l'activité coagulante des extraits enzymatiques..... 54
Influence de ph sur l'activité coagulante de l'EEB..... 54
Influence de la température sur l'activité coagulante de l'EEB..... 55
Influence de la concentration en $CaCl_2$ du lait 56
Influence de la concentration en extrait enzymatique brut 57
III. Essai de fabrication d'un fromage frais..... 58
1. Analyses physico-chimiques du lait cru utilisé..... 58
2. Analyses physico-chimiques du fromage élaboré type frais et le rendement fromager.....59
a. Analyses physico-chimiques du fromage.....59
b. .rendement fromage.....60
Iv. Les analyses microbiologiques..... 61
IIIv. Propriétés sensorielles des fromages..... 62
1. Résultats du test de dégustation 62
Gout..... 63
Odeur..... 64
Texture 65
Conclusion..... 66
Références bibliographiques 69
Annexes .....

Introduction

Introduction :

La transformation du lait en fromage est très fréquente dans le monde où il existe une très grande variété de celui-ci. Le fromage est connu depuis des temps immémoriaux par la plupart des cultures à travers le monde. Les indigènes le fabriquent par l'utilisation des procédures purement traditionnelles (sans addition de levains) pendant des siècles. Cette technologie de fabrication a été par la suite transférée d'un pays à l'autre au temps que les hommes se déplaçaient à travers le monde. **(Amimour ; 2019)**

Le fromage constitue un élément important dans l'alimentation humaine. Ses taux élevés en lactose, lipides et en protéines en font de lui un aliment nutritif, riche en énergie (**Walther et al ; 2008).** L'étape clé de la réussite d'un fromage quel que soit son type est la coagulation. Elle consiste à la formation d'un gel suite à des modifications physico-chimique intervenant sur les micelles de caséine du lait. L'agent coagulant le plus anciennement utilisé en fromagerie est la présure. Cette enzyme est extraite à partir de la caillette de veau non sevré **(Britten et Giroux, ; 2022).** L'augmentation de la production et de la consommation du fromage d'une part, et l'impossibilité d'augmenter en parallèle la production de présure d'autre part, ont causé une pénurie mondiale en approvisionnement en cet agent coagulant ce qui a engendré des fluctuations très importantes dans son prix. Ces problèmes sont aggravés notamment dans les pays musulmans, pour des raisons religieuses, dues aux rituelles de l'abattage **(Siar et al ; 2012).** Cette situation a suscité la recherche de produits de remplacement de la présure. De ce fait, plusieurs succédanés de présure de différentes origines ont été envisagés. Les enzymes de remplacement d'origine végétale sont extraites à partir du chardon (*Cynara cardunculus*), du latex du figuier *(Ficus caricas),* d'artichaut (*Cynara scolymus*), des feuilles du papayer (Caricapapaya)… etc **(Andrén, 2021 ; Nicosia et al ; 2022).** Les enzymes de remplacement d'origine bactérienne sont extraites à partir du genre Bacillus, Pseudomonas et d'origine fongique **(Bezie et Regasa ; 2019).**

Récemment, les protéases d'origine microbienne ont suscité un grand intérêt comme substituant de présure de veau. Les protéases fongiques, en particulier ceux de *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus* et *Endothia parasitica*, sont largement utilisés dans la production commerciale de fromage **(Jacob et al ; 2011**). En effet, certaines protéases bactériennes ont une activité coagulante élevée et des caractéristiques appropriées pour la production de fromage **(Shieh et al ; 2009).**

Introduction :.....

La présure est un coagulant du lait d'origine animale extrait de la caillette de jeunes ruminants avant sevrage, elle est composée de deux enzymes la chamoisine et la pepsine c'est la plus employée pour la coagulation du lait nécessaire à la fabrication des fromages **(Guevara et Raul ; 2018).**

Depuis quelques années de nombreux facteurs ont favorisé les recherches de succédanés de la présure de différentes origines (animales, végétales et microbiennes) en vue de la fabrication du fromage. Parmi ces facteurs, il faut citer le prix relativement élevé des préparations commerciales de présure et l'enzyme protéase qui est un ingrédient clé de la coagulation du lait pendant la technologie de fabrication du fromage ce dernier il est en crise en face à l'approvisionnement en présure animale suite à l'obligation d'éviter l'abattage de veaux de lait, source la plus importante de présure animale et les ressources en quantités limitées d'estomacs de ruminants, les régimes alimentaires les restrictions religieuses (casher et halal par exemple) ou l'interdiction de la présure de veau recombinante dans de nombreux pays européens (France, Allemagne et Pays-Bas).

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

Ce mémoire est décrit en deux parties : Premier partie, une revue bibliographique générale aborde la présure ainsi que ses alternatives d'origine anima et microbienne. Les micro-organismes impliqués dans la production fromagère. Le fromage et ses compositions ; les différents types de fromage ; l'origine de fromage ainsi que le processus de fabrication fromagère. Une seconde partie qui énonce le matériel et les méthodes utilisés à fin d'atteindre les objectifs de l'extraction et la caractérisation des enzymes coagulantes ainsi que les essais de la fabrication fromagère. Cette partie se termine par l'interprétation et la discussion des résultats obtenus. Enfin, une conclusion générale résume l'ensemble du travail précédent.

Chapitre I

Partie bibliographique

1.Présure :

1.1. Historique sur la présure

Le premier homme devenu fromager transportait du lait dans une vessie de ruminant pour office de sac, qui sous l'effet du temps et de la chaleur gélifia. véritable estomac, contient naturellement deux types d'enzymes, la chymosine (du grec khumós, qui signifie jus ou humeur) et la pepsine (du grec pepsis qui signifie digérer), responsables de la gélification du lait **(Roset ; 2019)**. En 1840, en France, **le pharmacien Deschamp**s décrit les propriétés enzymatiques de la présure et participe ainsi à la renaissance du terme chymosine, principe actif provenant de la caillette de veau. Face à l'instabilité de l'utilisation de caillettes de veau destinées à la préparation de présures, c'est en **1874 que Christian Ditlev Ammentorp Hansen** initie les débuts de la standardisation des présures animales et le début de son industrialisation. La présure (EC 3.4.23.4), une protéase aspartique, est l'enzyme clé utilisée dans le processus de production du fromage. La présure joue un rôle important pendant la maturation fromage, qui est un processus vital et complexe pour le développement équilibré de la saveur et de la texture **(Law et al ; 2011**). La présure de veau a été la première qui contient de la chymosine comme principal composant enzymatique. Elle a été la préparation enzymatique de coagulation du lait la plus largement utilisée. **(Law et al ; 2011).**

1.2. Enzymes coagulantes

Une enzyme est une substance organique produite par des cellules vivantes. Elle agit comme catalyseur dans une réaction chimique et est constituée de polypeptides **(Palashoff et Melissa ; 2008**). Les coagulants identifiés appartiennent à une famille appelée protéase aspartique (EC 3.4.23), et endopeptidases à cystéines (EC 3.4.22). Celles qui nous concernent le plus sont : la pepsine A (EC 3.4.23.1) et B (EC 3.4.23.3), la chymosine (EC 3.4.23.4), la mucorpepsine (EC 3.4.23.23) ou encore endothiapepsine (EC 3.4.23.22) **(Palashoff et Melissa ; 2008)**.La présure, préparation enzymatique extrait a partir de la quatrième poche d'estomac des jeunes bovidés préruminats, un été utilisé traditionnellement comme le principal agent coagulant dans la production fromagère.**(Bensmail et al ; 2013)**. Elle est constituée de deux enzymes principales: la chymosine et la pepsine, dont la proportion varie selon l'âge de l'animal**(Rogelj et al ; 2001).** le principal composant de coagulation du lait de la présure standard est de la chymosine (88 à 94%), bien que la présure animal mature puisse contenir jusqu'à 90a 94% de pepsine et seulement 6 à 10% de la chymo sinus **(Rogelj et al ;**

2001).Une enzyme coagulante destinée à la production fromagère possède la propriété d'hydrolyser les caséines laitières. . La coagulation repose sur le clivage spécifique de la caséine Kappa, la liaison Phe (105) et Met (106). Dans une autre mesure, une enzyme coagulante participe plus ou moins au clivage des caséines β et αS1 **(creamer, 1971 ،kaminogawa et al ; 1975). (Balabanova et al ; 2017)** .Elle est suivie d'une déstabilisation des micelles de caséine, accompagnée d'un accord de coopération et aboutissant ainsi à la formation d'une matrice protéique tridimensionnel. **(Amira et coll ; 2017)**.Ainsi, son rôle fondamental dans la coagulation enzymatique du lait, la pressure apparaît comme un élément clé influençant de la texture, la structure et les caractéristiques sensorielles distinctives des fromages dues à la libération d'acides amines au cours de ce processus enzymatique agissent comme précurseurs de réactions cataboliques ultérieures qui donnent lieu à la production de composés aromatique **(Fox et coll ; 2017)**.Il existe sur le marché quatre origines différentes de coagulants : animale, végétale, microbienne . **(Shah, Mir et Paris ; 2014)** et la plus récente issue de fermentation à partir de micro-organismes intégrant de l'ADN d'origine animale, nommée FPC (Fermented Produced Chymosin) **(Roset ; 2019**). Selon **(Faostat ; 2018)** La production des coagulants atteint aujourd'hui 22 millions de tonnes avec une progression annuelle de 2 %.

2.La composition de présure

2.1.La chymosine

Les chymosines (CE 3.4.23.4) peuvent être caractérisées comme gastriques fœtale de mammifères protéinases appartenant au groupe des protéases aspartique (CE 3.4.23.) **(Szecsie al ; 2013).** La chymosine est sécrétée sous forme de son zymogène, la prochymosine, qui est activée de manière autocatalytique lors de l' acidification à pH 2-4 par élimination d'un peptide de 44 résidus de l'extrémité N-terminale du zymogène. **(Isselnane et al ; 2014)** . La chymosine a une activité élevée de coagulation du lait mais une faible activité protéolytique générale et a ainsi évolué pour éviter la protéolyse et l'inactivation des immunoglobulines dans le colostrum **(Foltmann et Axelsen ; 1981)،(Balabova et al ; 2022).**La chymosine de veau est exprimée sous trois variantes génétiques A, B, C. La chymosine A (masse moléculaire 35,71 kDa) et la chymosine B (masse moléculaire 35,65 kDa) ne diffèrent que par l'acide aminé en position 254, qui est respectivement l'asparagine ou la glycine **(Kumar et al ; 2010)**. La chymosine A a une activité enzymatique plus élevée mais

subit une dégradation autocatalytique. La troisième forme allélique, la chymosine C, a été distinguée d'un produit de dégradation de la chymosine A par **(Rampilli et al ; 2005)** et il a été démontré qu'il présente une activité de coagulation du lait plus élevée. La rareté du gène est cependant responsable de la faible teneur en chymosilane C de la présure commerciale **(Uniacke-Lowe et al ; 2017).**

2.2.La pepsine

La pepsine est une protéinase, principalement utilisée dans les industries alimentaires, Porcins, les espèces ovines, bovines, avicoles et aquatiques en sontles principales sources**.(Benyahia-Krid et coll ; 2016)**.La pepsine comprend le groupe principal de protéases acides de l'estomac des animaux à sang chaud. La pepsine hydrolyse les liaisons N- et C-terminales, mais clive également les dipeptides synthétiques tels que Glu-Tyr ou Phe-Phe avec moins d'efficacité **(Júnior et al ; 2015 ; Rc et al ; 2021)**Cette enzyme est responsable de l'hydrolyse initiale et partielle des protéines dans l'estomac à l'aide de l'acide chlorhydrique sécrété ; le processus est complété par une action combinée de la trypsine et de la chymotrypsine dans l'intestin **(Sabapathy et Teo ; 1993**). La pepsine est active à pH acide (ph1)(**Zidoune et al ; 2017**) comme celui de la partie gastrique et peut hydrolyser plusieurs protéines, à l'exception des mucines, des spongines, de la conchioline, de la kératine ou des peptides de bas poids moléculaire **(Sumner et Somers ; 1947 ; Fange et Grove ; 1979)**. La forme inactive de la pepsine, le pepsinogène, est activée au contact du suc gastrique **(Guillaume et Choubert ; 2001 cité par Gilberto Moraes et al ; 2020).**

3.Les autres enzymes coagulant le lait

L'augmentation mondiale de la production et de la consommation de fromage, ainsi que l'augmentation du prix de la présure de veau, ont conduit à étudier de nouvelles enzymes coagulantes du lait capables de remplacer de manière satisfaisante la présure de veau dans la fabrication de produits laitiers (**Marilena Esposito et al ; 2016**) le principal agent coagulant du lait est la présure,dont l'utilisation est confrontée à la limitation assoiffée par l'abattage des veaux. Par conséquent, l'industrie fromagère traverse une crise d'approvisionnement à propos de ce coagulant. Cette situation a donné lieu à des recherches sur les enzymes peut remplacer la présure **(Ramet ; 1997).** Pré-inconvénients- par conséquent, l'intérêt industriel repose par conséquent, l'intérêt industriel repose uniquement sur le bétail et les porcs sont de la pepsine. Ils se sont avérés acceptables et sont ainsi, largement utilisé pour la fabrication du fromage en

préparation avec présure **(Cuvelier ; 1999)**. Parmi les présures possibles substituts, la production d'enzymes de coagulation du lait pour à partir de sous - produits végétaux **(Lopes et al ; 1998 ; Sidrach et coll ;2005)** et surtout de culture microbienne, sont d'intérêt- sant pour les fromageries locales et dans le monde entie (**Nouani ; 2011).**

En dehors de cela, certains facteurs religieux (Islam et judaïsme) et d'autres liés au végétarisme de certains consommateurs ont considérablement limité l'utilisation de présure de veau(**Bethelhem Abebe et al ; 2020).**

3.1.les enzymes coagulantes d'origine animale

Les enzymes de coagulation animale sont souvent des protéases gastriques ; la plus couramment utilisée est la présure, composée principalement de chymosine ou de pepsine . Selon la Fédération internationale du lait, la dénomination « présure » désigne un extrait coagulant issu de la caillette de jeunes ruminants abattus avant le sevrage. Il contient deux fractions actives : une majeure constituée de chymosine et une mineure de pepsine . La présure animale a une activité protéolytique qui cible spécifiquement les κ-caséines, augmentant le rendement en fromage et réduisant les pertes de protéines pendant la coagulation(**Hachana**, **Aloui et Fortina ; 2021**) L'action la chymosine est donc constituée de l'hydrolyse de cette k-caséine par clivage phénylalanine position 105 et moi neuf 106. Cette lyse libère l'a des caséines qui réagissent finalement avec calcium environnant résultant à la formation du caillot(. (**Beckers ; 2005).**

L'estomac du ruminant, en particulier le veau, est la source de présure. Il contient la chymosine (EC 3.4.23.4) comme principal enzymatique composant et a été largement utilisé dans le fabrication de fromages. Production de fromage augmenté de manière significative (3,5 fois plus élevé que dans 1961), mais la production de présure animale a diminué en raison de la disponibilité limitée d'herbivores estomacs . La présure animale est obtenue sur une base commerciale écailles provenant de l'estomac des jeunes ruminants (veaux, agneaux, chevreaux). Un seul veau produit seulement 5 à 10 g de présure. L'enzyme aide à coaguler la caséine dans le lait. La propriété du l'enzyme pour coaguler le lait est importante en termes de la qualité et du rendement du fromage **(Sorin et al ; 2021**).

Protéinases aspartiques gastriques sont des enzymes protéolytiques trouver à pratiquement tous organismes vivants. Au niveau de la tube digestif, ils sont responsables de de la digestion des protéines alimentaires-par hydrolyse des liaisons pep-rangez. Ils sont sécrétés sous formes

inactives appelées " pro enzyme-non " ou "zymogènes". Une Fois dans la lumière du tube digestif, ils devenez actif sous l'action de acide gastrique; Enzyme active agit ainsi directement sur les connexions peptides protéiques. Les essais les méthodes de classification des protéases ont atteint pour définir de grandes catégories-à savoir: sérine protéases, protéases de cystéine, métallo-protéases, protéases à thréonine et protéases d'acide aspartique .Pepsinogène et prochymosine appartiennent à ce dernier groupe qui comprend de nombreuses autres protéines c'est aspartique **(Beckers ; 2005**).

3.2.les enzymes coagulantes d'origine végétale

Les végétaux ont été les premiers objets de recherche en vue d'isoler les enzymes coagulantes. Celles–ci sont extraites par macération, de divers organes de plantes supérieures **(Manzoor et at ; 2014).**Les protéases végétales les plus largement utilisées sont la papaïne, la bromélaïne et la ficine, extraites respectivement de Carica papaya, Ananas comosus et Ficus carica.La plupart des protéases d'origine végétale ont été classées comme protéases à cystéine et plus rarement comme protéases aspartiques(**González et al ; 2011**).La majorité de ces enzymes de coagulation du lait végétal appartient à la famille des protéases aspartiques A1, étant actives à pH acide, inhibées par la pepstatine A et dotées de deux résidus d'acide aspartique responsables de leur activité catalytique. représentée par les extraits de fleurs du genre Cynara et, en particulier, de Cynara scolymus et Cynara cardunculus, contenant une multiplicité de formes moléculaires de protéases aspartiques.(**Esposito et al ; 2016**).Les fromages à base de coagulant végétal se trouvent principalement dans les pays méditerranéens, d'Afrique de l'Ouest et d'Europe du Sud. L'Espagne et le Portugal ont la plus grande variété et la plus grande production de fromages utilisant Cynara sp.(**Manzoor et al ; 2014).** Extraits des feuilles succulentes et des tiges de C. il a été rapporté que procera contient des enzymes de présure appelées calotropine qui coagulent le lait(**Bethelhem et al ; 2020**). L'activité enzymatique de la présure végétale est principalement associée à l'action des PA ou de ceux avec des résidus sérine et cystéine.[Citation 10] En fait, l'utilisation de différents types de protéases végétales dans la technologie fromagère influence le niveau de dégradation de la matrice protéique du lait, entraînant des différences dans les propriétés sensorielles du fromage.[Citation11] La plupart des présures végétales produisaient des fromages aux saveurs amères en raison d'un excès de PA, ce qui limite leur utilisation industrielle.[Citation12] Pour cette raison, la sélection d'un coagulant végétal approprié et le contrôle des différents

paramètres de gélification sont d'une grande importance pour obtenir une meilleure qualité de produit final. **(Ben Amira et al ; 2017).**

3.3.Les enzymes coagulantes d'origine microbienne

L'incapacité de la plante et protéases animales pour répondre aux demandes mondiales actuelles (en raison d'une utilisation intensive dans les domaines alimentaire, pharmaceutique et détergent l'industrie) a conduit à un intérêt accru pour la protéase microbienne .Parmi les différentes sources microbiennes disponibles pour la production de bactéries enzymatiques protéases est la source la plus importante . Les espèces de bacilles dominent le secteur industriel **.(Saraswathy et al ; 2013).** Beaucoup de protéases extracellulaires d'origine microbienne agissent de façon similaire que la chymosine et sont, en partie, adaptées à la production de fromage **(Robinson ; 1998**). Ces protéases montrent une forte activité protéolytique pendant la fabrication de fromage, ce qui peut entraîner une perte de protéine, un rendement plus faible, et la génération de saveur désagréable **(Harboe et al ; 2010).** Plusieurs enzymes de coagulation du lait d'origine microbienne ont été commercialisées et utilisées dans la fabrication du fromage, telles que les protéases aspartiques (APs) obtenues à partir de *Rhizomucor miehei, Rhizomucor pusillus* et *Cryphonectria parasitica* **(Ben Amira et al ; 2017**), *Parasitic endothy*, *Milky Irpex*, *Asper-black gille*, *Kluyveromyces lactis* and *Escherichia coli* **(Nouani ; 2011**) .Les MCE d'origine microbienne ont été largement utilisés Dans faire des fromages avec des avantages, tels que de grandes variétés de micro-sources biologiques, croissance rapide des microbes, grande diversité biochimique.réduction des coûts de production et modification génétique plus facile. Les MCE microbiennes sont caractérisées par une protéolytique généralement plus grande-activité et spécificité différente du substrat, et ceux-ciles caractéristiques pourraient intensifier la maturation du fromage ; L'activité protéolytique des MCE varie avec leurs microbes producteurs, conduisant à différents degrés de proteolysis dans le fromage pendant l'affinage et affectant la qualité du fromage à-hommages différemment (**Sarwar ; 2019**).À l'heure actuelle, la quasi-totalité des coagulants microbiens disponibles dans le commerce sont déstabilisables thermiquement en recourant en amont aux modifications chimiques **(Yegin et Dekker, 2013)**.

3.3.1Les enzymes d'origine fongique

Dans l'industrie laitière, les peptidases fongiques apparaissent comme des enzymes de substitution prometteuses pour la chymosine de veau qui est rare. Les peptidases fongiques permettent de résoudre des problèmes éthiques liés à l'utilisation de la chymosine et présentent également des avantages tels qu'une possibilité de production à grande échelle, à faible coût et en peu de temps(**Da Silva et al ; 2019**). Le MCE partiellement fongique de *Rhizomucor miehei* est utilisé dans la production commerciale de fromage. La plupart des MCE fongiques ont une forte thermostabilité et provoquent une AP résiduelle et une amertume élevées(**Yao Zhang et al ; 2022).**En effet, Il existe plusieurs auteurs indiquent que les protéases fongiques sont efficaces dans la coagulation du lait, comme celles issues de *Mucor sp*. et *Rhizomucor sp*. **(Kumar et al ; 2005; Merheb-Dini et al ; 2010; Yegin et al . 2011; Júnior et al ; 2015)**. Plusieurs protéases aspartiques fongiques ont été purifiés et caractérisés comme étant des succédanés de présures **(Gonzalez et al ; 2016)**. Les enzymes de type pepsine comprennent aspergillopepsine (aspergillopepsine I, EC3.4.23.18) chez les espèces *d'Aspergillus* **(Vishwanatha et al ; 2009)** et la *rhizopuspepsine*(EC3.4.23.21) pour les espèces de *Rhizopus* **(Kumar et al ; 2005).** Ces enzymes ont des poids moléculaires compris entre 30 et 50 kDa et contiennent des résidus d'acide aspartique conservés sur le site actif **(Gonzalez et al ; 2016**).(**Silva et al ; 2017),** dans une première étude approfondie sur les propriétés biochimiques de la peptidase aspartique sécrétée par le champignon Phanerocha et echrysosporium, ont montré que cette coagulase possède un potentiel d'application considérable pour la production de fromage.

3.3.2.Les enzymes d'origine bactérienne

Des études ont permis de mettre en évidence le potentiel de certaines bactéries à produire des coagulases. Ce sont surtout les genres Bacillu*s (Bacillus subtilis, Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*) et *Pseudomonas* qui ont été plus particulièrement explorés**(Green ; 1977 , ECK ; 2006**). La présure bactérienne semble être plus prometteur car sa production est moins chère, son biochimique la diversité est plus grande et sa modification génétique est plus facile (**Zhang, Qiao et Zhang ; 2021**) .Certains MCE bactériens présentaient un rapport MCA/PA élevé **(Zhang et al ; 2013)**. Cependant, les MCE bactériens sont moins fréquemment étudiés que les MCE fongiques. Le MCE bactérien en tant que substituts traditionnels du MCE

utilisés dans l'industrie alimentaire est peu signalé. Par conséquent, il est nécessaire de trouver diverses bactéries produites par le MCE pour le développement de substituts traditionnels du MCE.(**Yao Zhang et al ; 2022).**Récemment, certaines souches de Bacillus non pathogènes produisent avec succès des enzymes coagulantes de lait, *Bacillus licheniformis 5A5* **(Ahmed et Helmy ; 2012),** *Bacillus subtilis natto* **(Wu et al ; 2013) ,** *Paenibacillus spp strain BD3526* **(Hang et al ; 2016),** *Bacillus stearothermophilus* **(Ahmed el al ; 2016**), *Bacillus subtilis MTCC 10422* (**Kumari Narwal et al ; 2016)**, *Bacillus sp. P45* **(Lemes et al ; 2016).**

4.Extraction de présure

Le tableau 1 représente les différentes méthodes (précipitation au sulfate d'ammonium, extraction acide en tampon Tris–HCl ou HCl, suspension aqueuse) utilisées pour isoler et purifier les enzymes coagulantes issues de quatre types de sources : végétale, microbienne, animale et recombinante. L'objectif est de comparer protocoles et rendements selon l'origine du coagulant**.**

Tableau 1:techniques d'extraction des différents coagulants

Origine de l'espèce	Extraction	Références
Végétale *C.cardunculu*	Précipitation au sulfate d'ammonium	**(Alavi et Momen ; 2020).**
Végétale *Calotropis procera*	Mise en suspension 10 g de fleurs,préalablement broyées, dans 90 ml d'eau pendant 30 minutes.	(**Bethelhem et Al ; 2020. Rovira et al ; 2012).**
Microbienne *Bacillus licheniformis Bl 312*	Précipitation au sulfate d'ammonium	**(Yao Zhang et Al ; 2019**).
Microbienne *Bacillus amyloliquefaciens GSBa-1*	Extraction acide dans du Tris HCl 50 mM (pH 6,8)	**(Zhao et al ; 2019).**
Animale Pepsine de poulet	Précipitation au sulfate d'ammonium	**(BOHAK ; 1970).**
Animale Présure Porcine	Extraction acide dans du Tris HCL	(**Rosanna et al ;2015).**
Recombinante Rhisopus oryzae	Extraction acide dans du tris	**(Kumar et al ; 2005).**
Recombinante Kluyveromyces lactis.	Extraction acide dans du Tris HCL	**(Malaquias et al ;2017).**

5.Genre bacillus

Bactéries à Gram positif, aérobies ou anaérobie facultatif Capable de former des spores très résistant.Présents dans l'environnement (sol,eau, poussière) et peut contaminer lait pendant la traite ou le stockage .Certaines espèces sont résistant à la chaleur, ce qui leur permet pour survivre à la pasteurisation**(Logan et al ; 2009**). le genre Bacillus étant le plus grand et le plus

important. Cependant, les progrès modernes de la méthodologie taxonomique ont permis de révéler une immense diversité physiologique et génétique au sein des groupes de bactéries aérobies ayant la formation des endospores comme trait commun. Afin de mieux refléter cette diversité existante et de fournir des arrangements taxonomiques plus appropriés, de nombreuses descriptions valides de nouveaux genres et de nouvelles espèces ont été réalisées, ainsi que de nombreuses reclassifications devenues nécessaires. Aujourd'hui, le groupe des bactéries aérobies formant des endospores comprend plus de 25 genres et plus de 200 espèces**(Fritez ; 2004).** Classification et taxonomie de genre bacillus ; phylum Firmicutes; Order bacilliales; Famille Bacilliaceae **(Patel et al ; 2020).** Plusieurs espèces de Bacilles produire des protéases extracellulaire qui dégradent le caséine et autres protéines du lait. Ces enzymes peuvent être thermostables, ce qui les rend actifs même après traitement thermique du du lait**(Sorhaug et stepaniak ; 1997)** .Rôle majeur dans la dégradation des protéines multiplexées (caséine produits laitiers).ces enzymes hydrolytiques sont résistantes à la chaleur et conservent par conséquent une partie de leur activité après un traitement thermique applique conventionnelle dans les industries laitières telles que la pasteurisation et le traitement UHT. En ce qui concerne la qualité et les aspects économiques, les enzymes hydrolytiques thermostables ont l'effet le plus significatif dans les laiteries puisque ces enzymes entraînent des défauts de goutte et des problèmes technologiques tels que la sédimentation et la gélification dans le lait UHT**(Sorhaug et stepaniak ; 1997) (Ahmed et Rogers ; 1993)**.Plusieurs espèces du genre Bacillus sont impliqué dans la dégradation de les produits laitiers en raison de leur capacité à produire des enzymes thermorésistances, en particulier protéases et amylases ;*Bacillus subtilus ;Bacillus céreus*; Pathogène opportuniste ; *;Bacillus lichéniformes* ;*Bacillus pumilus* . et *Bacille amyloliquéfaciènes* **(wattesorn et al ; 2014)(Scheldeman et al ; 2006).**

6.Les mécanismes de la coagulation par la présure

La présure (préparation enzymatique coagulante) dans le lait libère le caséinomacropeptide (CMP) et induit une diminution de l'hydratation des micelles de caséine (passage de 2,5 g d'eau par gramme de caséine à 1,6 – 1,7 g/g à pH 6,60, et de la charge nette des micelles de caséine (cette charge passe de -15 -20 mV à -5 -8 mV) . Le mécanisme se déroule en trois phases principales(**Ilboudo et al ; 2012).**

6.1.Phase primaire

La présure attaque la composante qui stabilise la micelle de caséine (la caséine κ) au niveau de la liaison PHE105-MET106 . Il y a alors coupure de la chaîne peptidique en deux segments inégaux:le segment 1-105 est la paracaséine- κ et le segment 106-169, le caséinomacropeptide (CMP). La paracaséine- κ liée aux caséines αet β reste intégrée à la micelle hydrophobe et le CMP contenant tous les glucides est libéré et passe dans le lactosérum. Le CMP est la partie de la caséine κ qui est fortement chargée négativement et responsable des répulsions stériques et électrostatiques. La chymosine supprime cette chevelure stabilisante de la micelle (**Ilboudo et al ; 2012).**La plupart des aspartyl-protéinases sont des molécules à chaîne unique, dont la masse moléculaire est comprise entre 32 000 et 39 000 Da et qui sont constituées de ~ 330 acides aminés. Les protéinases aspartyles possèdent deux résidus réactifs d'acide aspartique dans leur site catalytique qui sont essentiels à leur fonction. Les deux résidus d'acide aspartique se trouvent dans deux séquences caractéristiques, Asp32-Thr-Gly-Ser dans le domaine N terminal et un Asp215-Thr-Gly-Ser/ Thr correspondant dans le domaine C-terminal.Les résidus Asp sont responsables de l'activation d'une molécule d'eau, qui sert de médiateur à la réaction nucléophile. Liaison peptidique scissile **(Yegin et Dekker ; 2013).**

6.2.Phase secondaire

C'est une étape d'agglomération de mécanisme encore mal connu. Lors de cette phase, les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes par intervention des ions calcium qui s'unissent à la partie chargée négativement des micelles diminuant ainsi les forces de répulsion électrostatiques auxquelles elles sont soumises ce qui favorise leur agrégation Cette phase est observable par la formation du gel. Le démarrage de cette phase nécessite qu'au moins 85 à 90% de la caséine κ soit hydrolysée. Le CMP se détache de la caséine κ et la micelle perd son caractère hydrophile. Il y a diminution de son degré d'hydratation et de son potentiel de surface. Des liaisons hydrophobes et électrostatiques s'établissent alors entre les micelles modifiées et vont entraîner la formation du gel **(Ilboudo et al ; 2012).**La structure secondaire est à 13 % hélicoïdale (9 hélices, 44 résidus) et à 48 % de feuillet (29 brins, 158 résidus) **(Palmer et al ; 2010)** cité par **(Uniacke-lowe et al ; 2017).** La protéine contient trois disulfures (Cys 47 -Cys 52, Cys 207 -Cys 211 et Cys 250 -Cys 283) et une six -proline (Pro 25), qui est conservée dans la mucorpepsine, l'endothiapepsine et la pepsine porcine **(Palmer et al ; 2010).**

6.3.Phase tertiaire

Les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations par la mise en place de liaisons phosphocalciques et peut-être des ponts disulfures entre les paracaséines. Ces mécanismes survenant au cours des phases (2 et 3) sont assez complexes et encore mal connus (**Ilboudo et al ; 2012).**Une illustration de la structure tridimensionnelle de la chymosine . la molécule existe sous forme de deux domaines séparés par la fente du site actif dans laquelle les deux résidus aspartyl catalytiquement actifs (Asp 34 et Asp 216) sont situés avec leurs chaînes latérales orientées vers la fente. La fente actif peut accueillir ~ 7 résidus de la κ-caséine séquence **(Uniacke-lowe et al ; 2017).**

7.Généralité sur le fromage

7.1.Définition

Selon la norme codex alimentaire (**CXS 283_1978 Amendements de 2022)** Le fromage est le produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou semi-dure, dure ou extra-dure qui peut être enrobé et dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine ne dépasse pas celui du lait, et qui est obtenu par coagulation complète ou partielle des protéines du lait, du lait écrémé, du lait partiellement écrémé de la crème ,de la crème de lactosérum ou du babeurre, seuls ou en combinaison, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation.Le fromage est une forme de préservation des nutriments essentiels du lait et constitue une excellente source de nutriments tels que les protéines, les matières grasses, les minéraux et les vitamines **(Raghunath et al ; 2014).** A l'échelle mondiale, il existe environ 1000 variétés de fromages différents **(Irlinger et Mounier ; 2009).**Le fromage est un des premiers moyens de conservation du lait (3000 ans avant notre ère), aliment rapidement périssable. Cependant, le fromage est un produit laitier « vivant » qui offre une stabilité relative et variable. **(Richonnet Céline ; 2015).**La dénomination"fromage" est réservée aux produits fermentés ou non obtenus par coagulation du lait, de la crème, du lait écrémé ou d'un mélange de ceux-ci, suivie d'un égouttage. Le fromage est fabriqué soit par la méthode traditionnelle en milieu rural et de manière traditionnelle, soit par les méthodes semi-industrielles ou industrielles qui restent limitées (**Guetouache et Guessas ; 2015).**La technologie permet d'obtenir une très grande variété de fromages selon la position et / ou l'intensité relative des phases "coagulation / acidification" et égouttage", la nature du lait mis en ceuvre (vache, chèvre, brebis - seuls ou en

mélange) et les traitements de standardisation (physicochimique et biologique).(**Romain et al ; 2008)**

7.2.Historique

La première utilisation d'un fromage comme aliment est inconnue. Les ethnologues tiennent la preuve que l'homme connaît depuis longtemps le phénomène de coagulation du lait. Cependant, l'origine exacte de la transformation du lait en fromage est incertaine. On s'entend pour dire que le fromage serait originaire du Sud-Ouest Asiatique et daterait d'environ 8000 ans **(Gelais et Collet ; 2002).**Depuis l'an 2800 avant JC les premières traces de fabrication du fromage sont dévoilées.Cependant, sa découverte est le fruit d'un simple hasard ; l'homme à découvert que sa denrée précieuse le lait peut être conservée sous forme de fromage et que la présure présente dans l'estomac de l'animal fait office de coagulant. Quelques cinq milles ans plus tard, le fromage a été fabriqué dans le monde entier **(Harbutt ; 2010).**

7.3.Composition de fromage

Le fromage a une longue histoire dans l'alimentation humaine à laquelle il apporte une quantité substantielle de nutriments importants; en particulier, les protéines, les peptides bioactifs acides aminés, lipides, acides gras, vitamines et minéraux (**Walther ; 2008**).Sa composition fine en composants d'intérêt nutritionnel tels que acides gras, vitamines, minéraux, oligo-éléments et composés antioxydants est beaucoup moins documenté **(Jean-Baptiste ; 2006).**

Le tableau 2 représente la concentration, en grammes par litre, des constituants majeurs (eau, protéines, lipides, lactose, calcium, phosphore) dans le lait de vache versus le lait de chèvre. Cette comparaison met en lumière les différences nutritionnelles et technologiques (rendement, texture, goût) entre les deux matières premières fromagères.

Tableau 2:Composition comparée des laits de vache et de chèvre. (Monsieur le Docteur Jean-Denis BAILLY., 2005

Composants chimiques	Lait de vache (g/L)	Lait de chèvre (g/L)
Eau	900	900
Matière protéique	32	30,8
Matière grasse	40,4	34,4
Lactose	48	48
Calcium	1,25	1,25
Phosphore	0,95	0,95

7.4.Fabrication de fromage

Le fromage est un système biochimique complexe et variable qui s'explique comme un gel de protéines concentrés englobant de la graisse et de l'humidité. La fabrication du fromage implique une gélification de la protéine du lait, une formation d'un caillé après déshydratation du gel et un traitement du caillé obtenu (par exemple : agitation à sec, cheddarisation, salage, moulage…etc). Le caillé moulé obtenu peut être consommé frais (peu de temps après sa fabrication) et sa qualité est fortement liée à la composition du caillé**(Amimour et Alioua ; 2019).**Cette dernière dépend particulièrement de la charge microbienne, la richesse en caséine et la qualité chimique et organoleptique du lait utilisé. Le caillé obtenu peut également être affiné pendant une période allant de 2 semaines à 2 ans pour donner un fromage affiné avec la saveur, la texture et la fonctionnalité appropriée(**Amimour et Alioua ; 2019).** La fabrication comprend trois étapes :

A. La coagulation du lait (formation d'un gel de caséines)

B. L'égouttage (déshydratation partielle du gel) qui aboutit à un caillé

C. Le salage.

Ces étapes concernent les fromages frais. Le reste des fromages subissent en plus une étape d'affinage, ce sont les fromages affinés **(Luquet ; 1990).**

7.4.1.Coagulation de lait

La coagulation du lait est une étape importante de la préparation du fromage. Il s'agit de la transformation du lait liquide en un gel, appelé aussi coagulum ou caillé qui, après un certain nombre de transformations, deviendra un fromage. Le processus de la coagulation est provoqué par l'action d'un coagulant (riche en chymosine), ajouté à un taux bien défini au lait de fabrication, sous des conditions de température et pH contrôlées.(**Boudjenah ; 2012)** . le lait va être caillé c'est l'étape de la coagulation. Les protéines du lait, ou caséines, vont coaguler afin de rendre la matière plus consistante et solidifier le lait. Cela se fait par acidification naturelle des ferments du lait **(Goudedranche et Camier-Ca ; 2001)**.Ce processus peut être accéléré en ajoutant de la présure qui est une enzyme issue de la caillette (partie de l'estomac des jeunes veaux nourris exclusivement au lait). Les caséines vont ainsi, par ce procédé, être prédigérées. Le lactose, qui est le sucre naturel du lait, va être transformé partiellement ou totalement en acide lactique **(Goudedranche et Camier-Ca ; 2001)**

- **Coagulation acide**

Acidification du lait affecte particulièrement les caséines. Même une légère acidification modifie suffisamment la structure micellaire de sorte que les caséines devenir instable à la chaleur(**Vignola ; 2002)** .Provoquée par le ferment lactique qui transforme le lactose en acide lactique.L'acidification aboutit à une diminution du pH du lait. La réduction du pH à environ 5.2-5.4 provoque une solubilisation de l'agent cémentant des micelles (phosphate de calcium colloïdal chargé positivement) avec diminution des charges négatives. Par contre, une réduction supplémentaire du pH à environ 1.2-4.6 provoque une désorganisation des micelles suivi d'une réorganisation des sous unités micellaires **(Law et Tamime ; 2010).**

- **Coagulation enzymatique**

Elle consiste à transformer le lait de l'état liquide à l'état de gel par action d'enzyme protéolytiques, d'origine animale, végétale ou microbien, qui ont la propriété de coaguler le lait **(Khoualdi ; 2017)** .Le gel obtenu de la coagulation par voie enzymatique est élastique, souple, peu friable, fortement imperméable et contractile avec un raffermissement important et rapide par rapport au gelactique **(Aissaoui ; 2014)**.Elle est obtenue par l'hydrolyse des caséines par des enzymes protéolytiques de diverses origines

a /Végétale b/ microbienne (enzymes extraits de culture liquide de certains champignons, exemple : *Rhizomucor miehi*) c/ animale : Les enzymes sont la chymosine et la pepsine contenues dans le suc gastrique des animaux. Les enzymes peuvent être apportées sous formes de préparation coagulante obtenue à partir de macération de caillettes, ou sous forme d'enzymes purifiées obtenues par voie génétique(**Bendimerad ; 2013)**

❖ **Coagulation mixte**

La coagulation résulte le plus souvent, d'une action conjuguée de l'acidification et des enzymes protéolytiques. Les gels formés par cette coagulation mixte possèdent des caractéristiques intermédiaires entre celles du gel obtenu par voie acide et celle du gel obtenu par voie enzymatique(**Amimour et Alioua. ; 2019).E**lle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. La multitude de combinaison conduisant à différents états d'équilibres spécifiques est à l'origine de la grande SCR diversité des fromages à pâte molle et à pâte pressée non cuite **(Romain al ; 2007).**

7.4.2.Égouttage

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 chimique du caillé et par conséquent l'affinage du fromage.Le processus d'égouttage est lié à des facteurs directs correspondant à des traitements de types mécanique et thermique, des facteurs indirects (acidification et coagulation enzymatique) et des facteurs liés à la matière première (richesse en caséine laitière, en protéines solubles et en matière grasse(**Aissaoui et Hamama ; 2014).**

7.4.3.Salage

Le salage est une opération indispensable dans la plupart des fromages (les fromages affinés) qui consiste à enrichir le fromage en chlorure de sodium.Par action sur l'activité de l'eau, le salage conserve le fromage, améliore l'arôme et accélère le mécanisme du séchage.(**Amimour et Alioua ; 2019).**

Le sel assure une meilleure conservation , contribue après le démoulage d'une plus belle croûte améliore le goût et donne de la consistance au laitage.Le sel joue un triple rôle : • Il exerce une action antiseptique. • Il détermine, selon sa préparation dans la surface, l'aspect et le goût du fromage. • Il pratique à la formation de la croûte, il est nécessaire à la conservation**.(Taleb et Boumediène ; 2021).**La teneur en sel des fromages varie selon le

type de fromage, en moyenne elle est de 0,5-2 g/100 g dans la plupart des fromages, dans certains cas (les fromages bleus et quelques fromages de chèvres), elle peut s'élever à 3-4 g/100g(**Aissaoui et Hamama ; 2014).**

7.4.4.Afinage

L'affinage est la transformation biochimique complexe des composants du caillé sous l'action des agents d'affinage, soient les enzymes. Elles ont trois origines différentes : les enzymes de coagulation (présure avec un effet protéolytique ou protéases microbiennes) ; les enzymes indigènes du lait (microflore du lait particulièrement : la plasmine, la cathepsine D et lipoprotéine lipase) et les enzymes des micro-organismes intervenant au moment de l'affinage (provenant des ferments lactiques ou des ferments secondaires).(**Amimour et Alioua ; 2019)** .Pour les fromages blancs, les opérations s'arrêtent avec l'égouttage ; Pour les autres commence l'affinage, une maturation biologique qui dure plusieurs jours à plusieurs mois. Elle exige de l'affineur le bon geste au bon moment une attention aiguisée, de la patience dans l'atmosphère contrôlée des caves ou des hâloirs c'est la phase ultime de la fabrication des fromages c'est aussi la plus complexe.(**Taleb et Boumediene ; 2021).**

8.Type de fromage

8.1.Fromage frais

Les « fromages frais » sont des fromages blancs non affinés qui ont subi une fermentation principalement lactique. Ils répondent à un critère supplémentaire : ils doivent renfermer une flore vivante au moment de la vente au consommateur **(Gemrcn ; 2009).** Ils se caractérisent par l'absence d'affinage après les étapes d'égouttage et de moulage. Tous les fromages frais ont une date limite de consommation de 45 jours **(Gariti ; 2007).**Ces fromages sont peu égouttés et ne sont pas affinés. Ils sont obtenus par coagulation des protéines du lait grâce aux ferments lactiques, qui acidifient le lait **(Chamba et Irlinge ; 2004).**Les « fromages blancs frais » ou « fromages frais » sont des fromages blancs fermentés qui remplissent un critère supplémentaire : leurs flore doit être vivante lors de la vente au consommateur **(Martinez ; 2009).**

8.2. Fromages à pâte pressée

Il s'agit des fromages dont le caillé est pressé après soutirage, puis mis à l'affinage **(Gemrcn ; 2009).** On peut distinguer deux sous-catégories et qui sont les suivantes **(Taleb ; 2017) .**Ces produits laitiers sont obtenus par pressage de caillé après soutirage, puis en les laissant mûrir

(Martinez ; 2009). On peut classer ces fromages en deux catégories : ceux à pâte pressée non cuite et ceux à pâte pressée cuite (pâte dure, caillé chauffé à 65°C) **(Majdi ; 2009).** Par conséquent, le caillage et l'égouttage présentent quelques différences. En effet, le caillé du fromage est pressé lors de moulage pour éliminer le petit-lait ou le lactosérum avant le processus d'affinage. Ils ont une teneur en eau inférieure à celle des fromages frais, mais contiennent d'avantage de minéraux tels que les sels de calcium **(Parente et Cogan ; 2004 ;Yildiz ; 2010).**

a. Pâtes pressées cuites

Ce sont des fromages à pâte pressée dont le caillé a subi un chauffage supérieur ou égal à 50°C pendant moins d'une heure afin de l'affermir au moment de son tranchage **(Gemrcn ; 2009).** Le résultat est une pâte compacte ornée parfois d'une croûte résistante et dont la texture peut être tendre, mollesse, ferme ou très granuleuse comme dans le cas du parmesan, le gruyère et l'emmenthal **(Branchet ; 2013).**

b. Pâtes pressées non cuites

Ce sont des fromages fabriqués à partir de lait de vache ou de brebis et qui peut être cru ou pasteurisé, dont le mélange caillé-sérum chauffé à une température inférieure à 50°C **(Gemrcn ; 2009)** .Ce qui leur donne une consistance dense et une couleur jaune pâle comme le cheddar. La croûte de ces fromages leur donne toute leur saveur et leur arôme. Elle peut être plus ou moins épaisse selon la durée de l'affinage **(Branchet ; 2013).**

8.3 Fromage à pâte persillée

Ces fromages sont caractérisés par un développement interne de la moisissure *Pénicillium roqueforti*, ces moisissures, en se développant donnent les marbrures vertes ou bleues qui persillent la pâte des fromages **(Goudedranche H et al ; 2002)**. Avant l'affinage, ils sont percés de trous très fins pour que le Pénicillium s'y développe **(Fournier A ; 2006).**



Figure 1 :Fromage à pâte persillé (journal des femmes cuisines)

8.4 Fromage fondus

La dénomination « fromage fondu » est réservé au produit obtenu par la fonte et l'émulsification de fromage ou d'un mélange de plusieurs fromages à pâte pressée, cuite ou non, refondus, additionnés de lait, crème ou de beurre **(Gemrcn ; 2009).** On obtient une texture plus ou moins molle et élastique et une saveur peu prononcée. Ces fromages ont l'avantage de se conserver longtemps **(Branchet ; 2013).**

8.5 Fromage à pâte molle

Les fromages à pâte molle sont des fromages affinés ou non ayant éventuellement subi, indépendamment de la fermentation lactique, d'autres fermentations, et dont la pâte n'est ni cuite ni pressée **(Gemrcn ; 2009).** Les fromages à pâte molle se répartissent en deux catégories définies par l'aspect de la croûte **(Taleb ; 2017).**Les fromages à pâte molle sont définis dans la norme internationale Codex Alimentaires **(Codex stan a-6-1973. Adopté en 1973. Révision 1999. Amendé en 2001)** comme étant tous les fromages dont la teneur la quantité d'eau restante après avoir retiré les matières graisses est supérieure à 67%. Ces fromages ont une texture molle, couramment crémeuse et veloutée avec une légère souplesse dans leur composition. Elles se distinguent par une couleur allant du blanc cassé au jaune pâle. Le fromage à texture molle se réfère spécifiquement au camembert, qui subit un affinage en surface, formant une croûte molle enveloppée par des moisissures blanches**(Mdahou ; 2017).**



Figure 2: Fromage à pâte molle type Camembert (Farhat, 2017)

a. Fromage à pâtes molle, à croûte fleurie

Les fromages à croûte fleurie sont recouverts d'une mince couche blanche de moisissures d'aspect velouté et de texture du veteuse. La pâte est souple et onctueuse. **(Taleb ; 2017).** On leur attribue des parfums de champignon, de levure, de mousse ou encore de terre humide, et leur saveur fait penser aux arômes des champignons. Parmi ces fromages **(Seminal ; 2015).**

b. Fromages à pâtes molle, à croûte lavée

Les fromages à croûte lavée sont soumis à des lavages en saumure légère qui ont pour but de maintenir l'humidité, la souplesse de la pâte et de la croûte **(Taleb ; 2017).**

Chapitre II

Partie expérimentale

Objectifs de travail

Étudier et comparer l'efficacité de différentes enzymes coagulantes (d'origine microbienne et animale) dans la coagulation du lait de chèvre, en vue de leur application dans la fabrication fromagère artisanale ou industrielle.

Lieu et période de travail

Les travaux de notre partie expérimentale (extraction des protéases microbienne et animale et l'isolement de la souche bactérienne) ont été effectués au sein de laboratoire de microbiologie au niveau de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Yahia Farés de Médéa pendant une période allant de mois de février jusqu'à mois avril. Les analyses physico-chimiques et microbiologiques du lait et des différents échantillons du fromage fabriqués à base des extraits enzymatiques bruts d'origine microbienne et animale ont été effectués au sein de laboratoire de la laiterie Arib Ain Defla pendant une période de quinze jours.

I. Matériel biologique

1. Origine de la souche

Une première étape du travail a consisté à isoler des micro-organismes susceptibles de produire des enzymes coagulant le lait, à partir du sol. La terre utilisée pour la recherche des micro-organismes a été prélevée à proximité de la laiterie Bousken commune de Beni Slimane Wilaya de Médéa

2. Méthode d'isolement de la souche

Après avoir apporté un échantillon du sol, il est conservé dans un réfrigérateur à une température de 4 °C. 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 g de terre tamisés sont pesés, puis broyés le plus finement possible afin de libérer au mieux les micro-organismes. Une petite quantité de sol 10g a été mélangée avec 90 ml d'eau physiologique stérile pendant 20 minutes par agitateur magnétique pour obtenir une dilution initiale (10^{-1}). On a effectué des dilutions en série pour chaque échantillon 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} ,10^{-5},10^{-7} ,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.), additionné de 12% (p /v) lait écrémé UHT et agent antifongique l'Amidase à 2% (p/v).

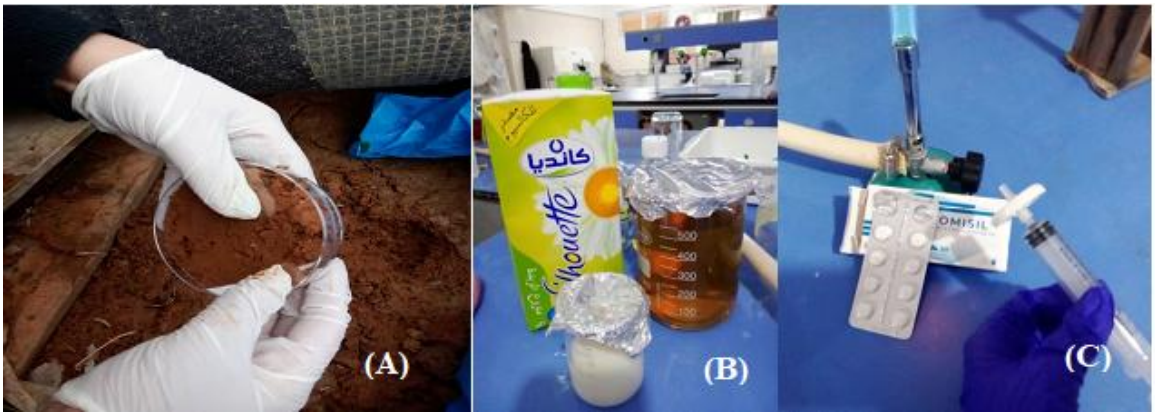


Figure 3 :(A) Prélèvement de sol (B) préparation de milieu de culture (C) antifongique

Des colonies présentant des morphologies distinctes, telles que la couleur **(technique de Gram) (annexe1)**, la forme et la taille, ont été choisies et purifiées par rayures en employant le même milieu. Avant de constituer le stock, nous avons vérifié et observé au microscope le pouvoir coagulant de chacun des isolats, avant leur intégration dans le stock

Les isolats bactérien ont été purifiés et les souches sélectionnées montrant une activité coagulante.

❖ **Test biochimique**

Test catalase

❖ **Principe**

La catalase est une enzyme oxydoréductase qui catalyse le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène selon la réaction suivante :

$$2H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\ H_2O$$

Cette enzyme est utilisée en microbiologie pour l'identification des bactéries; Elle est absente chez les bactéries anaérobies strictes, la plus part des bactéries a Gram négatif possèdent une catalase, mais pour les bactéries a Gram positif, la recherche de cette enzyme permet de

différencier ces bactéries par exemple les bactéries du genre Staphylococcus. Il s'agit de mettre en contact une colonie de la bactérie a étudiant en présence d'eau oxygénée, un dégazage de dioxygène signe la présence d'une catalase.

❖ **Lecture**: s'effectue par observation directe :

Si des bulles se forment, la bactérie possède la catalase ;

Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme. Catalase –**(pasteur)**

Test oxydase

❖ **Principe**

Une oxydase est une enzyme catalysant une réaction d'oxydo-réduction impliquant une molécule de dioxygène O2 comme accepteur d'électron, dans cette réaction, l'oxygène est réduit en eau H2O ou en peroxyde d'hydrogène H2O2 .La recherche d'oxydation est un test fondamental pour orienter l'identification des bactéries Gram négatif. Le chlorhydrate ou le N-diméthyl paraphénylène diamine (PDA) est utilisé comme réactif, imprègne généralement sur des disques (disques oxydases). Une colonie y est déposée avec une pipette pasteur sur le disque.

❖ **Conférence :**

S'il y a apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, la bactérie est oxydase positif (+) et elle possède l'enzyme respiratoire.

Si rien n'apparaissait, cela signifie que la bactérie est oxydase négative (-).**(pasteur)**

3. Obtention de l'extrait coagulant de la souche isolée

❖ **Revivication de la souche isolé**

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

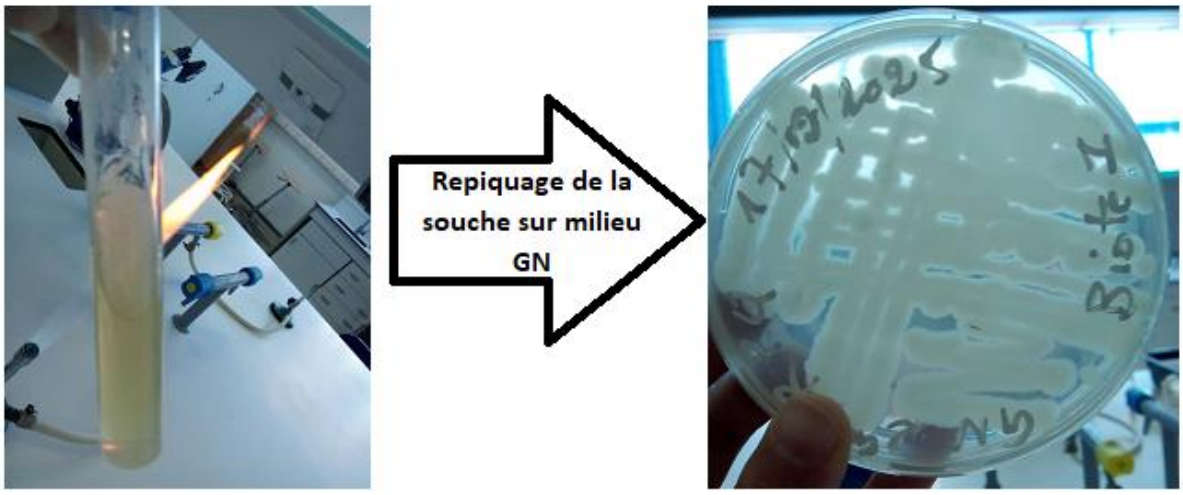


Figure 4: Revivification de la souche

❖ **Préparation de l'inoculum**

Après l'incubation à 30C° pendant 24 heures on gratte légèrement la surface de la gélose nutritive (GN) à l'aide d'une anse de platine stérile : elle est submerger dans une solution stérile d'eau physiologique (5 ml dans un tube à essai), ce dernier est agité à l'aide d'un vortex. Après l'agitation la suspension est ajustée au standard Mc Farland 5 à l'aide d'un spectrophotomètre UV Visible, ce qui correspond à une densité optique (DO) de 0.9 nm à une longueur d'onde de 600 nm. Le 5 Mc Farland est équivalent à 15 x108CFU/ml. Le nombre de bactéries est vérifié par un dénombrement sur milieu coulé (P.C.A) en boite de pétri.

Tableau 3 : Absorbance des différents MC Farland standard à 600 nm

MC Farland	Standard	0.5	1	2	3	4	5
Absorbance	/	0.08-0.1	0.257	0.451	0.582	0.669	0 .9
Approx.Cell density ($1x10^2$CFU/ml)	/	1.5	3	6	9	12	15

4. Préparation et inoculation de milieu de culture

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

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

Dans des Erlenmeyers de 250 ml On distribue de son du blé (2.5g et 5g) après on ajoutant 2,5 g de levure, 0,2 g de glucose, 0,1 g de caséine et 0,1 g de Na_2HPO_4 dans 50 ml d'eau distillée. Les erlenmeyers sont enveloppés de coton cardé enveloppé dans un filet de gaze et recouverts de papier aluminium. Ensuite, sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes, puis on ajoute 3 ml de l'inoculum dans chaque erlenmeyer. L'incubation se déroule à une température de 30°C pendant temps (24h ; 48h ; 72h), avec une agitation moyenne de 110 tours/min (**Posa et al ; 2003**).Améliorer le temps de coagulation peut être accompli en augmentant la dose de l'extrait coagulant et en diminuant la durée de coagulation. Nous avons réalisé six expériences, chacune comportant trois répétitions, afin d'optimiser la quantité de son de blé et la durée d'incubation.

4.2. Condition de fermentation

Une investigation a été conduite sur les conditions de fermentation enzymatique en se basant sur le milieu de culture préconisé par(**Rao et Mathur ; 1975),** dans le but d'optimiser le temps de coagulation. L'approche a consisté à augmenter la concentration de l'extrait coagulant tout en réduisant la durée de coagulation. À cette fin, six essais expérimentaux, chacun comportant trois répétitions, ont été réalisés afin de déterminer les conditions optimales relatives à la quantité de son de blé et au temps d'incubation.

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

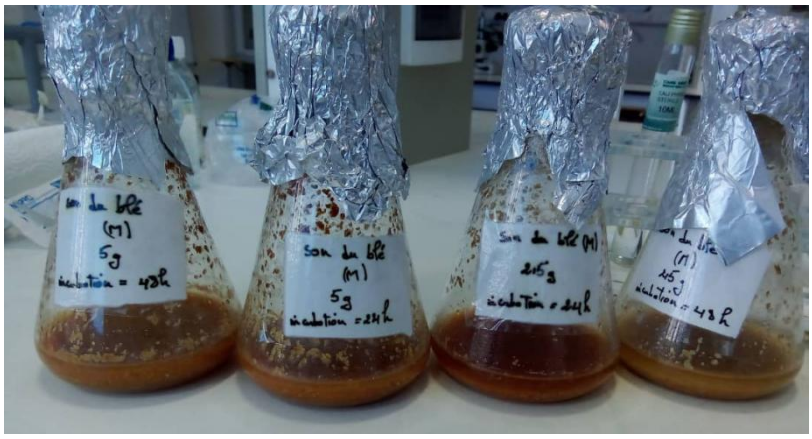


Figure 5 : fermentation semi-solide

5. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut microbien (EEBm)

5.1. Extraction de l'enzyme coagulante

Après l'incubation, le milieu de culture est filtré sur un tissu, le filtrat est centrifugé à 4000 trs /mn pendant 30mn à 4°C dans une centrifugeuse réfrigérée. Le surnageant ou extrait enzymatique brut (EEB) est maintenu à basse température pour la recherche des activités enzymatiques**(Rao et Mathur ; 1975) .**

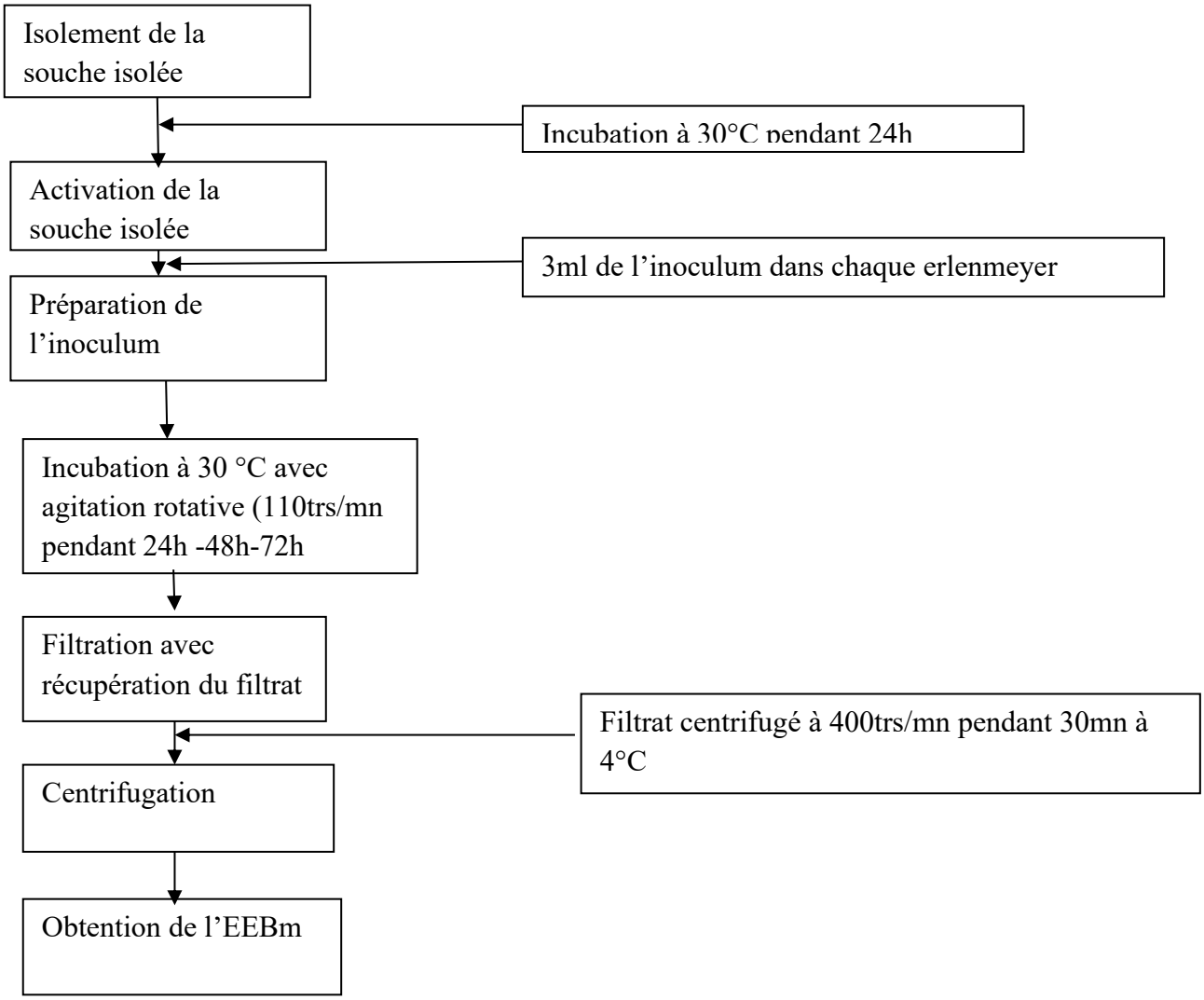


Figure 6 : Protocole d'obtention de l'extrait enzymatique brut produit par la souche isolée

II .matériel animal

1. Matière biologique utilisé

La matière première utilisée dans cette étude, pour l'extraction consiste en des caillettes de chevreaux à l'état frais, (4 mois) a été prélevée au niveau de l'abattoir de sidi Naâmane de Médéa.

Les caillettes transportées immédiatement après abattage sont lavées à l'eau et débarrassées de leurs graisses, congelées pendant 24 heures, à une température de -18°C. Elles sont broyées par la suite à l'aide d'un hachoir. Le broyat obtenu est conditionné dans des boites en plastique et conservé à une température de -18°C pour une utilisation ultérieure



Figure 7 : Caillette caprine

2. Obtention de l'extrait enzymatique brut animale (EEBa)

Après décongélation du broyat des caillettes, ce dernier est soumis à une macération dans une solution de HCl d'une concentration de 0,2 moles à une température ambiante Après cette période d'incubation, l'homogénat macéré est filtré à travers un entonnoir contenant de la gaze. La solution obtenue après filtration est centrifugée pendant une période de 20 min à 10.000 trs /min à 4°C. Le surnageant récupéré est filtré à travers un papier filtre plissé. Ensuite le pH du filtrat est ajusté à 5 par l'ajout de la soude (NaOH). Enfin, l'extrait enzymatique est conservé à une température de -18°C dans des flacons en verre

Étapes de l'extraction (réalisées par nos propres soins)

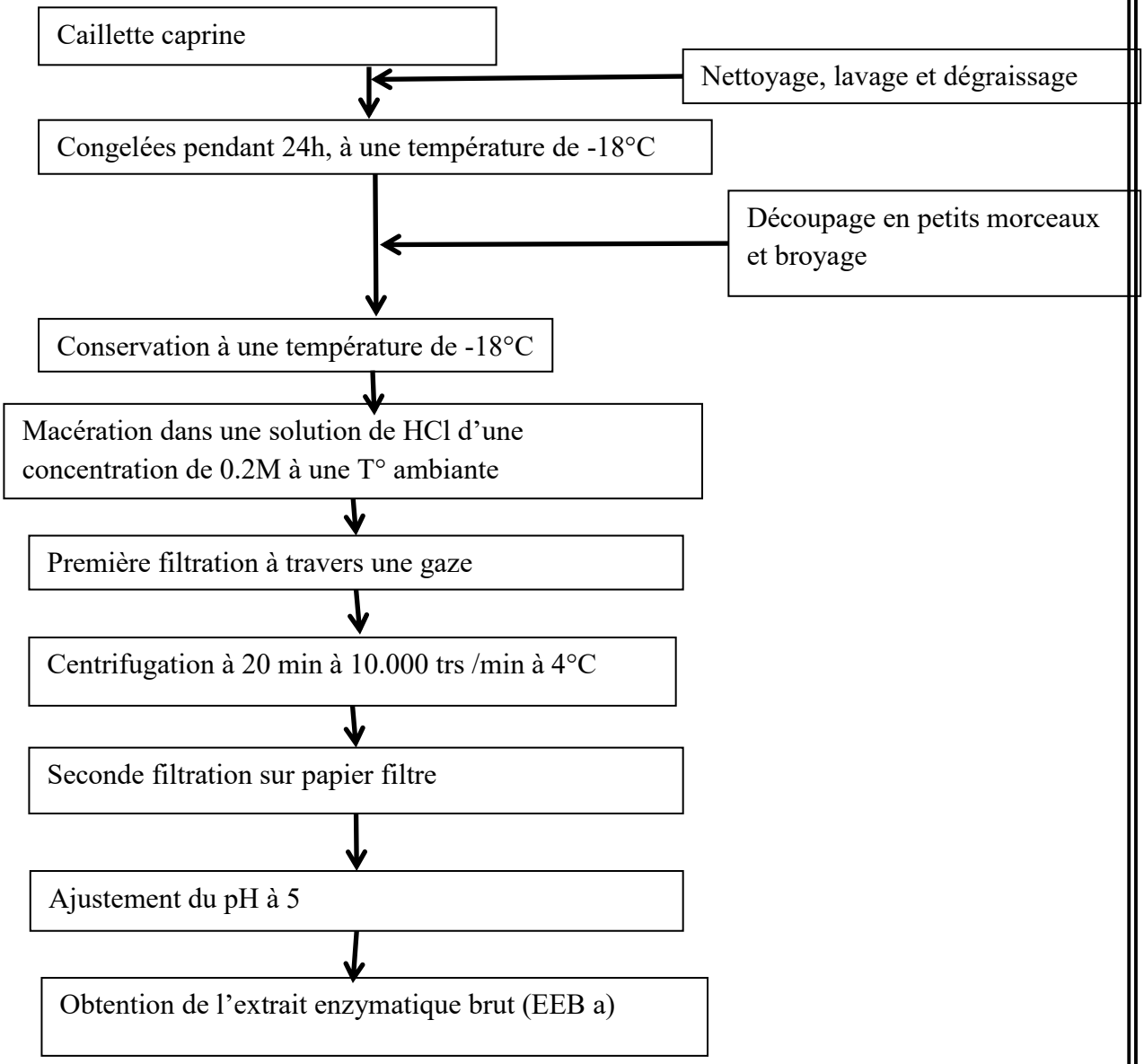


Figure 8 : Protocole d'extraction de la présure caprine

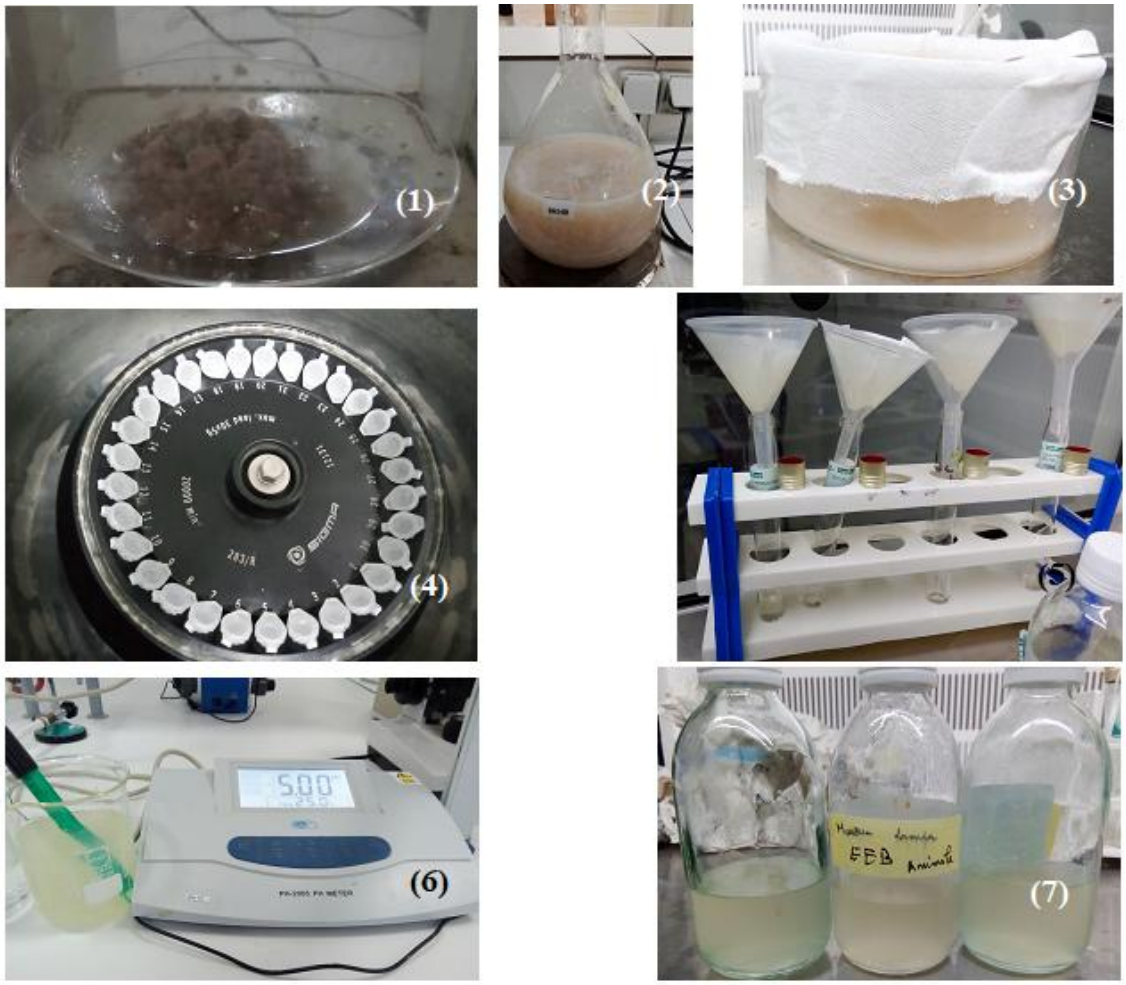


Figure 9 : les étapes d'extraction du la présure caprine

3. Mesure des activités enzymatiques (microbienne et animale)

❖ **Mesure de l'activité coagulante (AC)**

La mesure de l'activité de coagulation du lait a été réalisée en suivant le protocole décrit par **Siboukeur et al (2005) ; Shieh et al (2009)** avec des légères modifications. La poudre de lait écrème a été reconstituée en dissolvant 12g dans 100 de 0,5g/L de solution de $CaCl_2$ (pH 6,5) (substrat de Berridge**) (Berridge ; 1952) (Annexe 3)**. On a réalisé le test de coagulation en combinant 10ml de substrat avec 1ml d'extrait enzymatique. Sa fondation repose sur l'observation visuelle de l'émergence des premiers flocons. L'activité de coagulation est exprimée en unités Soxhlet (US).1US est défini comme la quantité d'enzyme de coagulation

dans 1 ml d'une solution contenant 0,12 g de lait écrémé en poudre et 0,11 g de $CaCl_2$ à 35 °C pendant 40 min. L'activité coagulante a été calculée en utilisant la formule suivante **:**

$$UP=10\times V/T\times Q$$

UP : unité présure

V= volume de substrat standard utilisé (ml)

T = temps de coagulation(en secondes)

Q =volume d'extrait coagulant (ml)

❖ **Temps de coagulation**

Le temps de prise est le moment où les premières gouttelettes de lactosérum se forment à la surface du gel, rendant le coagulum ferme et empêchant son écoulement sur les parois du tube **(Alais ; 1974).**

En général, le temps de prise pour la coagulation présure est approximativement deux fois plus long que le temps de floculation. Par conséquent, si le temps de floculation varie entre 12 et 15 minutes, le temps de prise sera alors entre 25 et 30 minutes **(FAO ; 1995).**

❖ **Force coagulante**

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.

$$F(US)= (2400 \times V) / (t \times v)$$

F : force de l'enzyme.

V : Volume du lait ajusté (ml). v : volume de la solution enzymatique (ml).

t: temps de coagulation du lait en minutes (m).Il existe une relation

$$UP=F(US) \text{ x } 0{,}00457$$

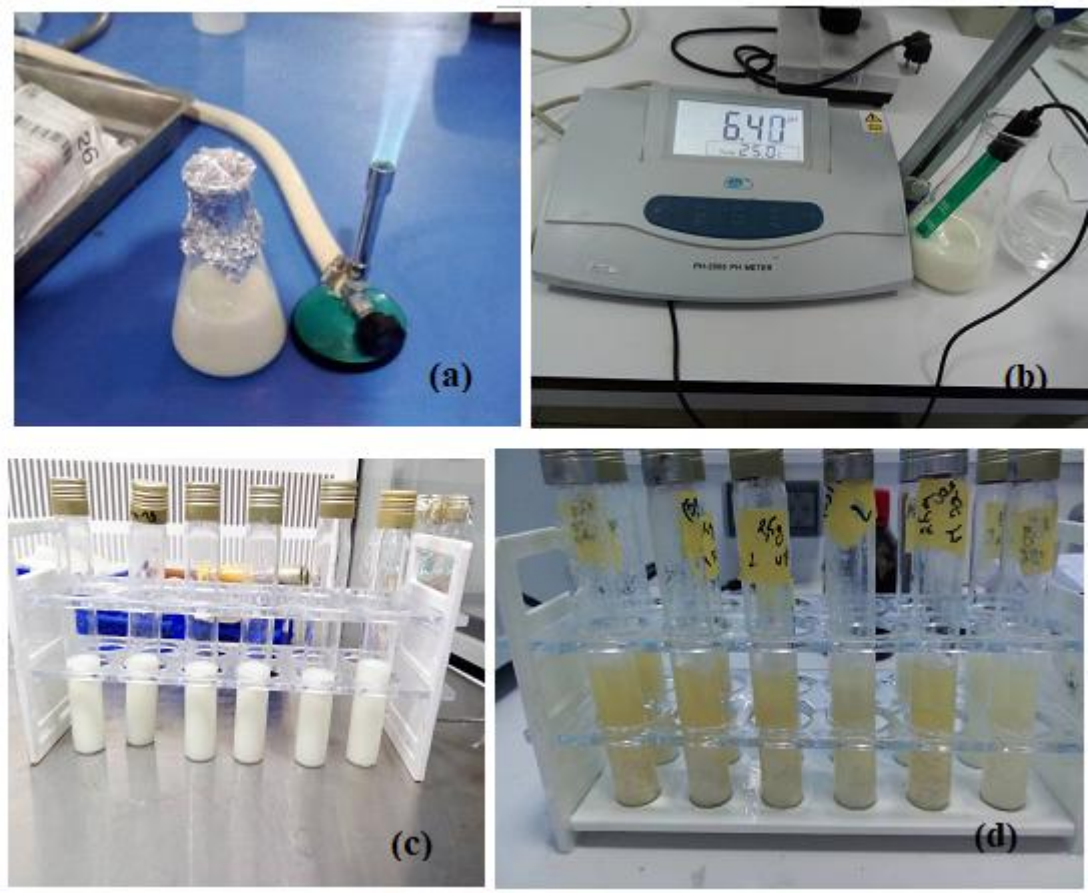


Figure 10 :Protocole de l'activité coagulante

❖ **Mesuré de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique (AP) a été mesurée selon la méthode de **Green et Stackpoole (1975)**; **Siboukeur, Mati et Hessas (2005) ; Shieh, Phan Thi et Shih (2009**) **Silva et al (2014).** Un mélange d'extrait enzymatique brut (0.2ml) dans 0.4ml le tampon acétate (0,2mol/l; pH 5,5) (1ml) a été incubé à 35°C pendant 30 min. L'addition de 1ml d'acide trichloracétique à 10% Puis à 2 ml de filtrat, sont ajoutés 5ml de la solution NaOH (0.28) puis on ajoute 1 ,5 ml du réactif de Folin (solution de folin-ciocalteau phénol : eau =1 :2), Après agitation, on incube à 35°C pendant 10 min, puis la DO est mesuré à 660 nm **(annexe 4).**

❖ **Détermination de l'indice AC/AP**

D'après **Abdel-Fattah, El-Hawwary et Amr (1974)** le rapport entre l'activité coagulante et l'activité protéolytique (AC/AP) dans les préparations enzymatiques est un indicateur de la qualité des présures de substitution par rapport aux présures d'origine **(Brutti et al ;**

2012). Cette méthode permet d'évaluer si une préparation enzymatique peut coaguler le lait de la même façon que la présure**.**

❖ **Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique**

La méthode est basée sur une technique de colorimétrie qui fait référence à une courbe standard construite à partir d'une solution de protéine pure (BSA). On mesure la DO à 660 nm. (**Lowry et al ; 1951) (Annexe 5).**

4. Caractéristique de l'extrait enzymatique

❖ Afin de détermination des conditions optimales de l'activité coagulante qui extraites à partir de la souche isolée ont procédé à l'étude de paramètre qui influence sur le lait : le pH, la température et la concentration en $CaCl_2$.

L'activité coagulante a été évaluée en déterminant le temps de coagulation du lait, en ajustant les valeurs du paramètre analysé en accord avec les conditions standards (T=35°C, pH=6.4 , concentration en $CaCl_2$ =0.01M

- **Influence de la température**

La température optimale de coagulation de lait a été déterminé an portant la déférente température de lait 30°C à75°C avec in intervalle de 5°C, et les autres paramètres sont établis selon les conditions standard (pH=6.4 /concentration en $CaCl_2$ =0.01M)

- **Influence de pH du lait**

Le pH optimal de coagulation de lait a été déterminé an faisant varier le pH 5.4 à 7.2 avec un intervalle de 0.2 en utilisant du HCl et du NaOH 1N, et les autres paramètres sont fixé selon les conditions standard (température = 35°C /concentration en $CaCl_2$=0.01M).

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

La concentration en $CaCl_2$ a été déterminé an faisant varier la concentration de lait en CaCl2 de 0.01M à 0.1 par palier de 0.01M et les autres paramètres sont fixés selon les conditions standards (T°=35°C pH=6.4).

- **Influence de la concentration en enzyme**

La concentration optimale en enzyme a été déterminé an faisant varier la concentration en enzyme 0.1 à 1.2mg/ml par palier 0.5mg/ml et les autres paramètres sont fixé selon les conditions standards (pH=6.4/T°=35°C /concentration en $CaCl_2$=0.01M).

III. Essai de fabrication de fromage

1. Introduction

Notre travail était réalisé au sein de l'unité LAIITERIE ARIB « Ain Defla ».

Le prélèvement et l'échantillonnage au cours de production à savoir (lait cru, crème fraîche jusqu'à le produit fini) ont été réalisés au niveau de l'unité en utilisant les méthodes citées dans la partie expérimentale.

Les échantillons pour laboratoire sont transportés, en respectant des conditions, vers les laboratoires en vue de les analyser, à savoir :

Les analyses physico-chimiques sont effectuées dans le laboratoire d'analyses physico-chimiques de l'entreprise LAIITERIE ARIB

Les analyses microbiologiques sont effectuées au niveau de laboratoire d'analyses microbiologique au sein de la même entreprise

2. Analyses physico-chimiques de lait

2.1. Objectif

Le contrôle physico-chimique a pour but d'analyser la matière première et le produit fini, en mesurant les différents paramètres (Tº, Aº, EST, MG, ESD, Densité, pH, G/S…). Elle présente l'avantage de signaler toute erreur de fabrication et toute modification des paramètres au cours des procédés de fabrication, et renseigne sur le remède possible à appliquer.

2.2. Méthodes

2.2.1. Détermination de l'acidité titrable

❖ **Principe**

Titrage de l'acidité par une solution alcaline en présence de phénolphtaléine **(annexe 6) .**

❖ **Expression de résultats**

L'acidité est égale à v/2 où v : est le volume de la soude Nécessaire au titrage.

AT= V*10(°D)

AT = Acidité titrable.

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

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

2.2.2. Détermination de la teneur en matière grasse

❖ **Principe**

Dissolution des protéines par addition d'acide sulfurique, séparation de la MG par centrifugation favorisée par l'alcool ISO amylique. Obtention de la MG en g/ l par lecture directe sur l'échelle du butyromètre **(annexe 6)**

Faire lecteur

M.G en g/l= (B-A).10

Ou : **A** : niveau inférieur

B : au point le plus bas du ménisque supérieur a de la colonne liquide

2.2.3. Détermination de la densité

❖ **Principe**

La densité d'un liquide est le rapport entre la masse volumique de ce liquide et celle d'un même volume d'eau à 20°C. Elle est réalisée au moyen d'un thermo-lactodensimètre

❖ **Expression des résultats**

*Si la température est de 20°C, le niveau de flottement correspond à la graduation de lecture de densité.

*Si la température est inférieure ou supérieure à 20°C, il faut soustraire ou additionner respectivement le nombre de graduations qui séparent le niveau de la température correspondante à 20°C.

D=D°+-0.2 (20-T°)

Ou : D : densité finale

D°: densité donnée par thermo lactodensimètre.

T°: température lue sur le thermo lactodensimètre.

0.2: coefficient empirique.

2.2.4. Détermination de l'extrait sec totale (la matière sèche totale)

L'extrait sec total (EST) représente l'ensemble des composants du lait qui forment la matière sèche du lait et qui résulte de la dessiccation du lait.

❖ **Principe**

La matière sèche du lait est la masse exprimée en pourcentage pondéral. Elle est exprimée par la masse en gramme de la matière sèche du lait

L'extrait sec total (évaporation ou élimination de l'humidité du lait) est mesuré au moyen d'un dessiccateur, équipé d'un système de chauffage avec deux lampes à rayonnement infrarouge et d'un clavier permettant la programmation des paramètres d'analyse

❖ **Expression des résultats**

si la température est de 20°C, le niveau de flottement correspond à la graduation de lecteur de densité.

2.2.5. Détermination de l'extrait sec dégraissé

❖ **Définition**

La teneur en matière sèche dégraissé est la masse exprimée en pourcentage des résidus après dessiccation et sans la teneur en matière grasse. Le résultat est donné par la formule suivante :

ESD= EST – MG

Ou : ESD : extrait sec dégraissé.
EST : extrait sec total.
MG : matière grasse

2.2.6. Détermination du pH

❖ **Principe**

Le PH représente l'acidité du lait à un moment donné. On le mesure habituellement à l'aide d'un PH-mètre **(Vignola et al, 2002).**

❖ **Lecture**

La lecture des résultats se fait directement à partir de l'affichage sur le cadran du pH mètre.

.2.2.7.Détermination de la température

La température de lait cru est mesurée à l'aide d'un thermomètre. Elle est exprimée en °C.

❖ **Expression des résultats**

La lecture de la température s'effectue directement sur la graduation du thermomètre

3. Préparation de fromage frais

Dans cet essai le but est d'étudier les aptitudes à la coagulation du lait des enzymes extraites (d'origine microbienne et animale) et les propriétés physico-chimiques et sensorielles des fromages préparés, par comparaison avec la présure commerciale.

3.1. Procédé de fabrication

L'essai de fabrication comprend en trois essais : le premier est réalisé avec l'EEB microbien, le deuxième avec l'EEB animal et le troisième essai était réalisé à base de la présure commerciale provenant de la laiterie ARIB « Ain Defla ». Ces essais ont été réalisés au niveau du laboratoire suivant le procédé pratiqué au niveau de l'unité ARIB « Ain Defla » en respectant les conditions de fabrication industrielle ainsi que l'emploi des mêmes ingrédients.

3.2. Fabrication de fromage

La transformation du lait en fromage comporte trois étapes principales : la coagulation, l'égouttage et l'affinage. Cette dernière étape n'existe pas dans le cas des fromages frais **(Evette ; 1975).** La qualité du lait de fromagerie est fonction de son aptitude à donner un bon fromage, dans des conditions de travail normales, avec un rendement satisfaisant**.** Elle dépend d'un certain nombre de caractéristiques du produit tels que sa composition chimique, sa richesse en caséines, sa charge microbienne et la nature de sa microflore, son aptitude au développement des bactéries lactiques. Elle dépend aussi de son comportement vis-à-vis de la présure **(Remeuf et al ; 1991).**

3.3. Etape de fabrication de fromage

3.3.1. Pasteurisation du lait

Le lait chèvre est chauffé à environ 75°C pendant 5 min pour éliminer les bactéries pathogènes, puis refroidi à environ 35-37°C .

3.3.2. Ensemencement

On ajoute des ferments lactiques (0.375g) pour acidifier le lait et amorcer la fermentation, ajouté le chlorure de calcium ($CaCl_2$ =2ml).

3.3.3. Emprésurage

Après une durée de maturation de 30 min à une température ambiante

Après On ajoute une petite quantité de présure (enzyme) pour aider la coagulation.

• F EEBa= 1/1 21.21 ⟹ la dose=16 ml/2l

• F EEBm= 1/ 117.64 ⟹ la dose=17ml/2l

• F Présure commerciale=1/5000 ⟹ la dose =1ml/2l

3.3. 4. Coagulation

Après l'emprésurage le lait est laissé au repos à une température ambiante pendant14 à 16 h .il va prendre en masse (caillage) avec une consistance plus ou moins ferme selon le dégrée d'acidité développée.

3.3.5. Découpage du caillé

Le caillé est découpé grossièrement pour libérer un peu de petit-lait, sans trop le briser (car il est fragile) .

3.3 .6. Égouttage

Il s'agit d'une phase essentielle qui conditionne directement la composition du fromage qui se traduit par une séparation manuelle du caillé du lactosérum par filtration à l'aide d'un tissus et laissé égoutter, pendant 6 à 8 h.

3.3.7. Moulage

Le caillé est versé dans des moules ou faisselles, souvent à la louche pour ne pas le casser.

3.3.8. Conservation

On conserve le fromage frais à une température de 4°C.

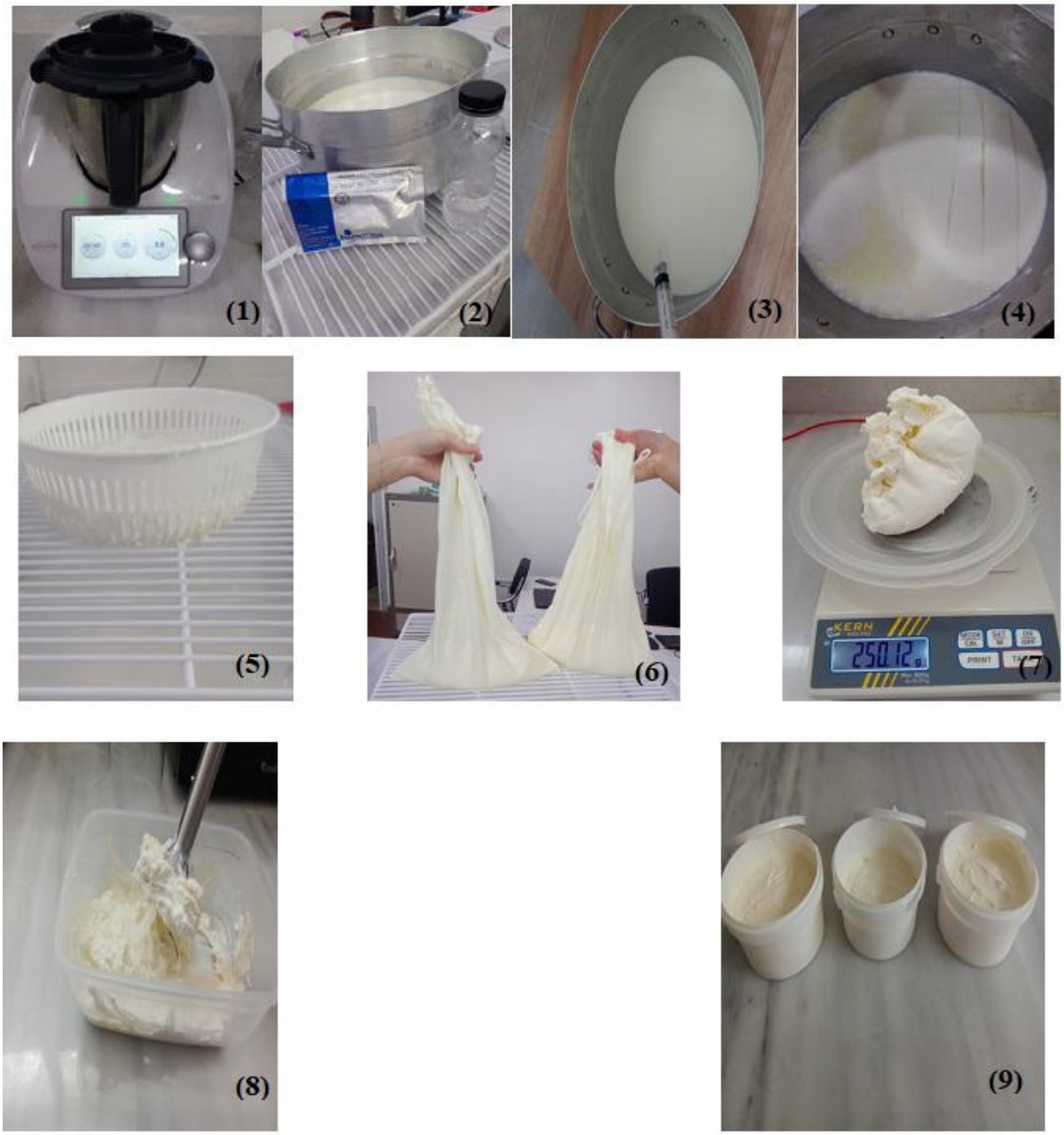


Figure 11 :les étapes de fabrication du fromage

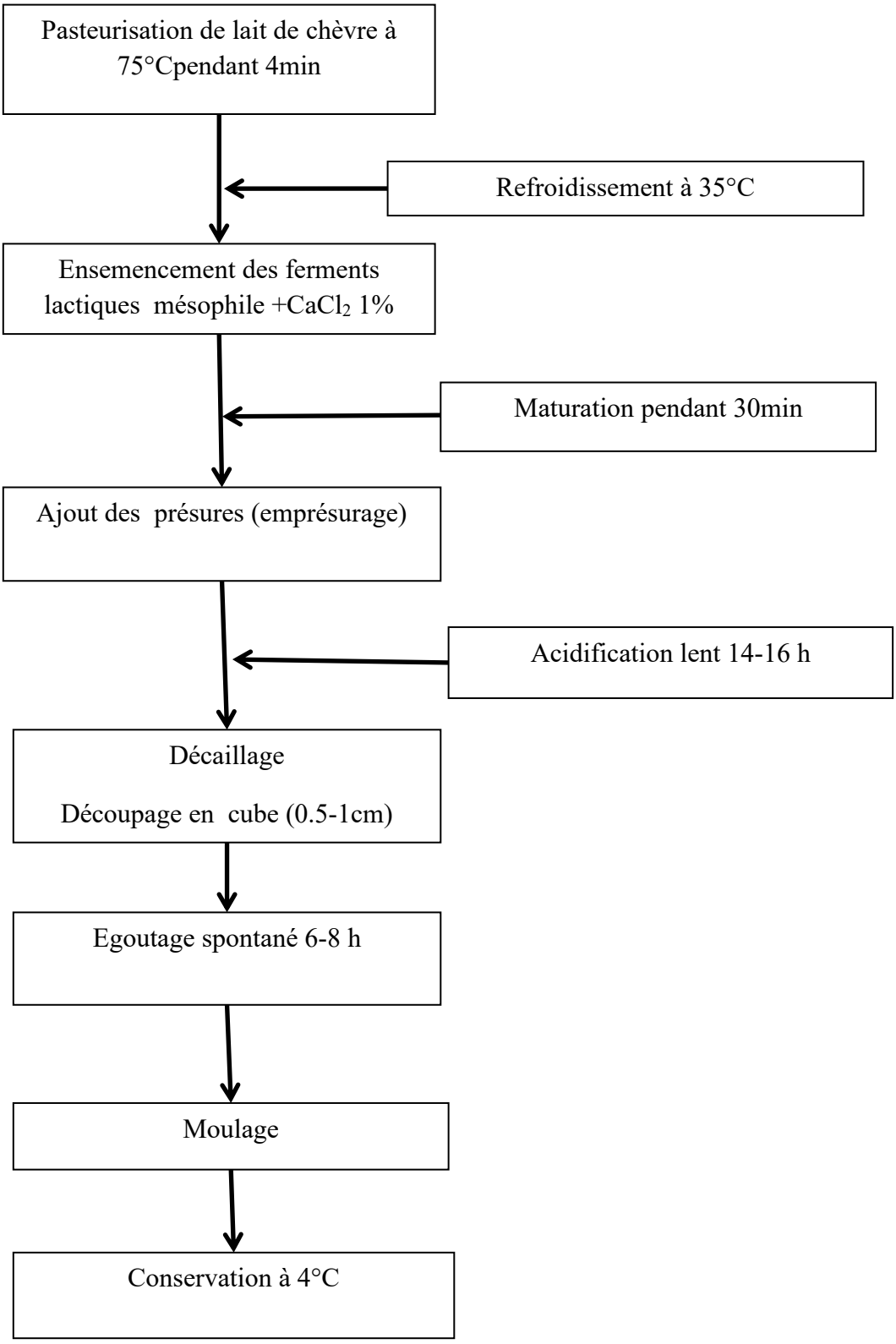


Figure 12 : Étapes générales de fabrication de fromage frais

3.3. Analyses physico-chimiques de fromage

Les analyses physico-chimiques sur les produits finis se font après une journée de fabrication (j+1) pour autoriser la sortie du produit dans le cadre de sécurité alimentaire et pour assurer la qualité commerciale du produit.

3.3.1. Détermination du pH

Le pH dépend de la concentration d'un milieu en protons ; il est le logarithme de la concentration molaire de l'ion hydronium (H3O+) **(Jaques ; 1998).** La mesure du pH d'un aliment nous renseigne sur sa fraîcheur **.**Après avoir étalonné le pH mètre à l'aide de deux solutions tampons (pH=7/pH=4), la sonde du PH mètre est directement introduite dans les échantillons, la valeur du pH sera directement affiché sur l'écran de l'appareil **(AFNOR ; 1980).**

3.3.2. Mesure de l'acidité titrable

L'acidité titrable est exprimée par la titration avec une solution d'hydroxyde de sodium (1/9 N) en présence de la phénolphtaléine comme indicateur coloré Après avoir introduit 10 ml du produit dans un bêcher de 100 ml à l'aide d'une pipette graduit, 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine ont été ajoutées. Titrer avec NaOH (1/9 N) jusqu'au virage à la couleur rose pâle facilement perceptible pendant 10 s et lire la chute de la burette.

3.3.3. Mesure de l'extrait sec total

La matière sèche est la masse restante après dessiccation complète **(AFNOR ; 1999).** A l'aide d'une seringue, 4 g du produit ont été déposés sur la coupelle en aluminium mise sur le dessiccateur, puis l'échantillon est étalé à l'aide d'une spatule, puis la dessiccation est activée. Le résultat est exprimé en pourcentage. Chaque produit à sa propre durée de dessiccation**.**

3.3.4. Détermination de la teneur en matière grasse

La détermination de la teneur en matière grasse consiste tout d'abord à digérer les protéines par l'acide sulfurique, suivie de la séparation de la matière grasse du produit contenu dans un butyromètre par centrifugation. La séparation est favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool iso-amylique **(AFNOR ; 1999).** Un volume d'acide sulfurique 1.52 g/L (5 mL) et 3g de fromage sont introduits dans un butyromètre. Agiter énergiquement pour dissoudre complètement la caséine avec un mouvement horizontal . Ajouter 1 mL d'alcool iso-amylique et compléter jusqu'à l'échelle de lecture avec l'acide sulfurique à 1.522 g/L .Homogénéiser avec des mouvements de va et viens et placer le butyromètre dans un bain marie entre 65 à 70°C jusqu'à la dissolution du produit et l'apparition de la matière grasse, ensuite centrifuger

à 1200 T/min pendant 10 min, puis faire une lecture rapide.Le taux de matières grasses est lu directement sur le butyromètre, chaque graduation correspond à 0.1 % de matière grasse

3.3.5. Détermination de l'extrait sec dégraissé

Définition

La teneur en matière sèche dégraissé est la masse exprimée en pourcentage des résidus après dessiccation et sans la teneur en matière grasse. Le résultat est donné par la formule suivante :

ESD= EST – MG

Ou : ESD : extrait sec dégraissé.

EST : extrait sec total.

MG : matière grasse

3.3.6. Rendement fromagère

Le rendement fromager présente un grand intérêt en industrie fromagère car il reflète globalement comment a été réalisé la répartition quantitative des constituants du lait lors de l'égouttage. Il nécessite un taux élevé en extrait sec et plus précisément en protéines (caséine) et des concentrations élevées en matière grasse **(Naoani ; 2009).** Elle s'obtient selon la formule ci-dessous **(Vignola ; 2002)** :

Rf(%) = (poids du fromage /poids du lait) × 100

4. Analyse microbiologique

4 .1. Objectif

Habituellement, quatre objectifs sont visés :

*Recherche des germes capables d'altérer la qualité marchande du produit : leur présence au-delà d'un certain seuil rend le produit impropre à la consommation mais non dangereux pour le consommateur.

*Recherche des germes potentiellement pathogènes pour le consommateur : les germes recherchés sont connus pour leur rôle pathogène (salmonella, listeria…).

*Recherche des germes de contamination fécale. Deux catégories de bactéries connues pour leur résistance dans l'environnement (les coliformes et les « streptocoques fécaux » ou entérocoques) sont les marqueurs habituellement cherchés.

*Recherche des germes dits indicateurs technologiques. Cette recherche s'effectue habituellement sur une denrée alimentaire qui a subi un traitement de stabilisation, par

exemple la pasteurisation. Dans ce cas, la mise en évidence d'une bactérie végétative serait une preuve d'une défaillance du traitement thermique appliqué **(Choisy et al ; 2003).**

4.2. Prélèvement et échantillonnage

Les récipients utilisés pour le prélèvement des échantillons doivent être stériles. Les prélèvements doivent se faire avec une asepsie rigoureuse. Les échantillons doivent être transportés rapidement au laboratoire selon des conditions définies. **(Choisy et al, 2003)**

***Préparation de l'échantillon pour essai**

Chaque fois qu'il est nécessaire de suivre le procédé d'homogénéisation du produit. Les prises d'essai sont effectuées sur l'échantillon homogénéisé en tenant compte de la nature des produits et des opérations analytiques à conduire. Elles sont en principe de 10 ou 25 ou 50 g ou ml (dans ce dernier cas 25 g ou ml sont réservés à la recherche des salmonelles).

4.3. Préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique : (JORA N° 70 du 7 novembre 2004)

- **Principe**

Préparation de la dilution primaire (suspension mère) c'est nécessaire, et des dilutions décimales suivantes en vue de réduire le nombre de micro-organismes par unité de volume, pour faciliter l'examen microbiologique.

4.4. Méthodes de recherche et dénombrement des micro-organismes

4.4.1. Recherche et dénombrement des G A M T

- **Définition**

Appelés aussi "Flore totale" ou nombre très approximatif des germes qui se trouvent dans les produits alimentaires.

Ces micro-organismes peuvent par leurs quantités dégrader la denrée, altérer sa qualité marchande et provoquent des troubles digestifs ou allergiques chez le consommateur.

La flore peut être saprophyte ou pathogène, originelle ou apportée lors des manipulations.

- **Incubation**

Les boîtes seront incubées couvercle en bas à 30 °C pendant 72 h avec :

Première lecture à 24 h ;

Deuxième lecture à 48 h ;

et troisième lecture à 72 h.

- **Lecture**

Les colonies des GAMT se présentent sous forme lenticulaire en masse**.**

- **Expression des résultats :**

Le dénombrement s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte les facteurs suivants :

Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies,

Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution,

Faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions

4.4.2. Recherche et dénombrement des Entérobactériaceae

A partir des dilutions décimales allant de 10^{-3} à 10^{-1}, porter aseptiquement 1 ml dans les boites de Pétri vides préparées à cet usage.

Compléter ensuite chaque boite avec environ 20 ml de gélose VRBG, fondue puis refroidie à 45±1°C.

Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de bien se mélanger à la gélose utilisée.

Incubation

Une série de boites sera incubée à 37°C, pendant 24 h et servira à la recherche des Entérobactériaceae

- **Lecture**

Dénombrer les colonies rose ou rouge qui se développent sur la gélose suite au virage de couleur de l'indicateur coloré (rouge de méthyle) vu la dégradation du glucose de milieu par les Entérobactériaceae.

- **Dénombrement**

Il s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boites en tenant compte des facteurs de dilutions, de plus :

- ne dénombrer que les boites contenant entre 15 et 300 colonies,
- multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution,
- faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

4.4.3. Recherche et dénombrement d'*Escherichia-coli*.

Dans les laits et produits laitiers, les Coliformes sont dénombrés :

• soit en milieu liquide par la technique du NPP (nombre le plus probable) à l'aide du bouillon VBL (bouillon Lactosé bilié au vert brillant) réparti à raison de 10 ml par tubes munis d'une cloche de Durham.

• soit en milieu solide, sur le milieu au Désoxycholate à 1‰.

A partir des dilutions décimales allant de 10^{-3} à 10^{-1} voire 1, porter aseptiquement 2 fois 1 ml dans deux boites de Pétri vides préparées à cet usage et numérotées comme l'indique le schéma n°6.

Compléter ensuite chaque boite avec environ 20 ml de gélose au Désoxycholate à 1 ‰ ou à défaut par de la gélose VRBL ou VRBG, fondue puis refroidie à 45±1°C.

Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de bien se mélanger à la gélose utilisée.

- **Incubation :**

Une série de boites sera incubée à 37°C, pendant 24 à 48 h et servira à la recherche de Coliformes totaux,

L'autre série sera incubée à 44°C pendant 24 à 48 h et servira à la recherche de Coliformes fécaux.

Que ce soit à 37 ou à 44°C, les premières lectures se feront au bout de 24 h et consistent à repérer les petites colonies rouges ayant poussé en masse mais fluorescentes, ce qui signifie que la lecture doit se faire dans une chambre noire et sous une lampe à UV.

Les autres colonies non fluorescentes ne sont ni des coliformes totaux ni des coliformes fécaux.

- **Dénombrement**

Il s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boites en tenant compte des facteurs de dilutions, de plus :

- ne dénombrer que les boites contenant entre 15 et 300 colonies,
- multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution,
- faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.
- il est impossible de trouver plus de Coliformes fécaux que de Coliformes totaux.

4.4.5. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

- **Définition**

Les *Staphylococcus aureus* appartiennent à la famille de Micrococcaceae. Ce sont des cocci à Gram positif, non sporulés, aéro–anaérobies facultatifs, immobiles, halophiles, se divisent en plusieurs plans en formant des amas irréguliers, coagulase, protéase et catalase positives.

- **Incubation**

L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 à 48 h

- **Lecture**

Seront considérés comme positifs, les tubes ayant virés au noir.

Pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un développement de *Staphylococcus aureus*, ces tubes feront l'objet d'un isolement sur gélose Chapman préalablement fondu, coulée en boîtes de pétri et bien séchée.

Les boîtes de Chapman ainsi ensemencées seront incubées à leur tour à 37 °C pendant 24 à 48 h. après ce délai, repérer les colonies suspectes à savoir les colonies de taille moyenne, lisse, brillantes, pigmentés en jaune et pourvues d'une coagulase et d'une catalase

- **Expression des résultats**

*si à la dilution 10^{-3}, le tube a noirci au bout de 24 h d'incubation, mais à l'isolement sur Chapman il n'y a pas des colonies caractéristiques ; ce tube est considéré comme négatif.

*si par contre à la dilution 10^{-1}, le tube a noirci au bout de 24 h d'incubation, et à l'isolement, il y a des colonies caractéristiques, il faut tenir compte de la dilution en question, car le nombre réel de *Staphylococcus aureus* correspond à l'inverse de la dilution. Dans ce cas, il y a donc 10 *Staphylococcus aureus* par g ou ml du produit à analyser.

- **Epreuve de la coagulase**

Pour s'assurer de la spécificité des colonies de staphylocoques, procéder comme suit :

Soumettre au moins cinq colonies typiques par boîte, en les transférant dans des tubes contenant du bouillon spécial, à raison d'une colonie par tube.

Faire incuber à l'étuve, à 37 ± 1° C, pendant 24 h.

Introduire 0,5 ml de chaque culture ainsi obtenue, dans un tube stérile distinct, contenant 0,5 ml de plasma de lapin, bien mélanger.

Faire incuber à l'étuve, à 37 ± 1°C, et examiner les tubes après 2 h et 6 h d'incubation, en vue de déceler toute coagulation du plasma de lapin.

Si au moins cinq colonies coagulent le plasma de lapin, conclure à la présence de staphylocoques à coagulase positive dans la dilution correspondante de l'échantillon.

- **Epreuve de la catalase**

* Placer une goutte d'une solution de peroxyde d'hydrogène sur une lame de microscope.
*Prélever une colonie avec une pipette pasteur et l'émulsionner doucement dans la goutte de H_2O_2 une des deux gouttes.

*Observer immédiatement et après 5 minutes s'il y a apparition (catalase positive) ou absence (catalase négative) de bulles d'oxygène.

4.4.5. Recherche de *Salmonella*

- **Définition**

Les bactéries de genre *Salmonella* appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae dont elles possèdent les principaux caractères :

Bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs, habituellement mobiles grâce à une ciliature péritriche, mais *Salmonella gallanirum* est toujours immobiles, elles possèdent une catalase, réduisent les nitrates en nitrites, fermentent les glucoses avec production d'acide et de gaz.

- **Incubation**

Elle se fait à 37 °C pendant 24 h.

- **Lecture**

Une réaction positive est indiquée par le virage de la couleur du milieu au rouge brique.

- **Isolement**

Le tube et/ou le flacon positifs fera/feront l'objet d'un isolement sur le milieu sélectif "Hektöen".

- **Lecture**

Les Salmonelles se présentent sous forme des colonies bleues vertes au centre noir sur gélose Hektöen.

- **Confirmation** :

Toutes les colonies caractéristiques feront l'objet d'une identification morphologique biochimique et sérologique qui se déroule comme suit :

- état frais (forme, mobilité),
- coloration de Gram (forme et Gram),
- ensemencement dans un tube de TSI qui sera incubé à 37 °C pendant 24 h (fermentation des glucides, production du gaz et de H_2S).
- ensemencement dans un tube de gélose nutritive inclinée qui sera incubé à 37°C pendant 24 heures.

Chapitre III :

Résultats et Discussion

1. Identification de la souche

2. Étude macroscopique et microscopique

Tableau 4 : observation macroscopique et microscopique

La souche	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Gram
Souche isolée	Colonies brillants blanchâtres	Petites Bacilles sporulées en apparence	+

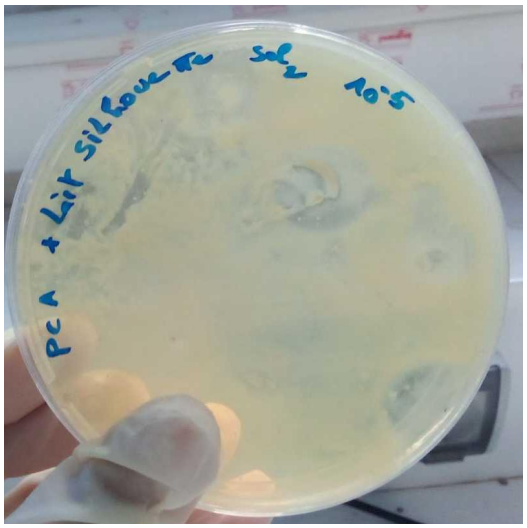


Figure 13 : dégradation de caséine

La souche a formé un halo transparent sur le milieu PCA supplémenté avec 12 % de lait, ce qui indique qu'elle est capable d'hydrolyser la caséine. Cela témoigne de son activité protéolytique.

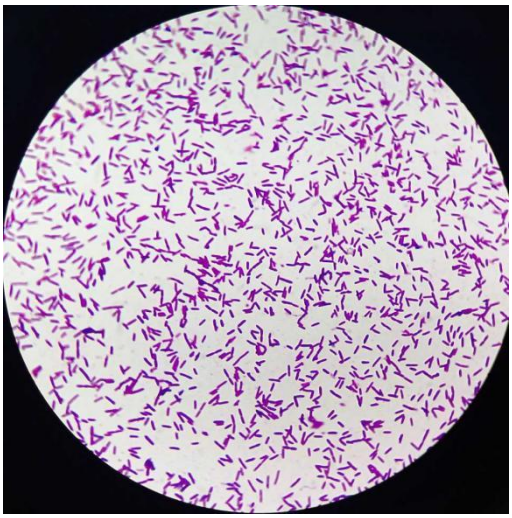


Figure 14 : observation microscopique de la souche isolée (Photo originale, 2025)

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

3. Teste catalase

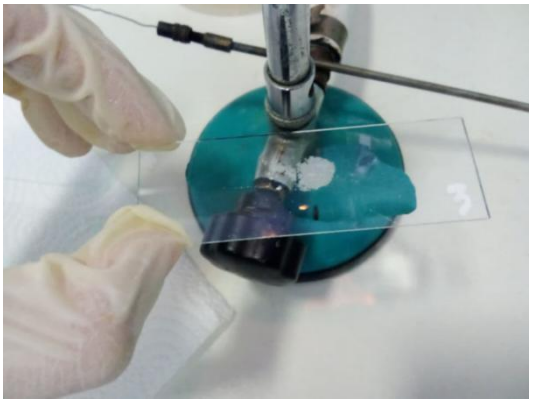


Figure 15 : teste catalase (photo originale 2025)

S'effectue par observation directe :

Si des bulles se forment, la bactérie possède la catalase ;

Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

4. teste oxydase



Figure 16 : teste oxydase (photo originale2025)

S'il y a apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, la bactérie est oxydase Positif (+) et elle possède l'enzyme respiratoire.

Si rien n'apparaissait, cela signifie que la bactérie est oxydase négative (-).

Tableau 5 : identification de la souche

Test catalase	Test oxydase	Coloration de Gram	La souche isolée
+	+	+	***Bacillus sp***

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

1. Production d'enzyme coagulant le lait

a. Conditions de fermentation

Tableau 6: Conditions optimales de fermentation de la souche Bacillus

Essai	**2.5g/24h**	**2.5g/48h**	**2.5g/72h**	**5g/24h**	**5g/48h**	**5g/72h**
Le temps de coagulation	32min	11min	3min	40min	12min	3min 40s

D'après le résultat obtenu (tableau 6) • L'essai n°03 (2.5g de son du blé /72h) a donné le temps de coagulation le plus meilleur.

De ce fait, on a opté pour cet essai pour la suite de notre expérimentation.

2. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

2.1. Caractère apparent de l'extrait enzymatique

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

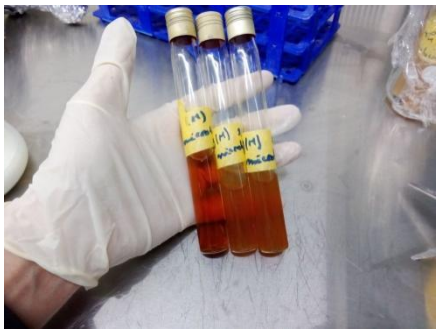


Figure 17 : extrait enzymatique brut microbienne

2.2. L'Activité coagulante de l'EEBm

Après l'extraction, l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut issue de *Bacillus sp* a été déterminée par les méthodes de **Soxhlet et de Berridge**. Les résultats obtenus sont rapportés dans **le tableau 07.**

Tableau 7 : Activité coagulante de l'extrait enzymatique brut

	Activité coagulante (Up)	Force coagulante (Us)
EEB de Bacillus	0.49	117.64

La force coagulante de notre extrait brute est de 1/117.64 ce qui implique qu'un ml d'extrait enzymatique coagule 117.64 ml de substrat de Berridge. De même notre activité coagulante est de l'ordre de 0.49 Up. **(Voir tableau 07).**

Tableau 8 : Comparaison de l'AC de l EEB aux autres AC des coagulases

Préparation enzymatique	Unité présure (UP)/ml	Force coagulante (F) US	Références
Bacillus sp	**0.49**	**117.64**	**Notre échantillon**
Aspergillus Niger	**0.373**	**82.88**	**(Bensmail ; 2012)**
rhizomes de gingembre	**5.88**	**1411.76**	**(Zhor et al ; 2015)**
Mucor pusillus	**0.34**	**1200**	**(Zhor et al ; 2015)**
Pepsine de poulet*	**15,08 ± 0,86**	**4559 ± 330**	**(ADOUI ; 2005)**
Présure de poulet	**323,62 ± 44,56**	**70815 ± 1865**	**(ADOUI ; 2005)**
Bacillus amyloliquefaciens D4	_	**4645.16**	**(He et al ; 2011)**
Bacillus sp. P45	_	**239**	**(Lemes et al ; 2016)**
Bacillus mojavensis P47M	_	**5400**	**(Kahlouche et Noauni ; 2017)**

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

Cette valeur est bien comparée aux activités coagulantes des autres souches. En effet, on remarque que l'activité coagulante de notre souche est plus forte par rapport *Aspergillus Niger* **(Bensmail ; 2012)** et *Mucor pusillus* **(zhor et al ; 2015)** et faible par rapport les autres souches rhizomes de gingembre **(Zhor et al ; 2015),** Pepsine de poulet et Présure de poulet **(ADOUI ; 2005),** *Bacillus amyloliquefaciens D4***(He et al ; 2011),** *Bacillus sp. P45***(Lemes et al., 2016) et** *Bacillus mojavensis P47M* **(Kahlouche et Noauni, 2017). (Voir le tableau 8).**

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

❖ **Activité protéolytique**

Durant le processus de coagulation du lait, il est essentiel de déterminer le niveau de protéolyse des extraits enzymatiques coagulants, qu'ils soient d'origine animale, microbienne ou végétale**.** Ce phénomène est généralement indésirable en technologie laitière car il est à l'origine du développement d'amertume retrouvé dans les produits fromagers **.**

Tableau 9 : activité protéolytique

	activité protéolytique	Référence
Bacillus sp	0.925	Notre échantillon
EEB de *Bacillus mojavensis*	0.547	**(Kahlouche and Nouani ; 2017)**
EEB de *lactobacillus casei* L26	0.76	**(Osaana et al ; 2007)**
EEB Bacillus velezensis	0.362±0.001	**(Boumadiene et al ; 2021)**
Présure	0.115±0.002	**(Chwen et al ; 2010)**

Dans notre étude, nous avons observé forte activité protéolytique d'EEB de l'ordre de0.925. En se basant sur nos résultats nous pouvons constater que l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut de *Bacillus sp* est largement supérieur à celle de l'EEB de *lactobacillus casei L26* **(Osaana et al ; 2007)**. Ainsi, l'action de rupture de la liaison Phe105-Met106 de la caséine K par les aspartyl protéases comme l EEB est semblable à celle de la chymosine et les autres protéases d'origine fongique et bactériennes **(Sidrach et al ; 2005)** ; aussi le résultat est supérieur à EEB de *Bacillus mojavensis* **(Kahlouche et Nouani ; 2017) ;** EEB Bacillus velezensis **(Boumadiene et al ;2021) et** Présure **(Chwen et al ; 2010). (Voir le tableau 9).**

❖ **Détermination de rapport AC/AP**

La mesure de l'indice AC/AP permet de confirmer le pouvoir coagulant de succédanés de la présure.

Tableau 10 : rapport AC/AP

Espèce microbienne	AC (UP/ml)	AP (Ucas/ml)	AC/AP
Bacillus sp	0.49	0.925	127.18
EEB Bacillus velezensis	122,05±3,29	0.362±0.001	338.12
Présure	537±1.8	0.115±0.002	4669,6

Dans nos conditions expérimentales, l'indice AC/AP de EEB microbienne a été évalué à 127.18. En effet, le ratio AC/AP obtenue par l'EEB est beaucoup plus faible par rapport à celui obtenu par **(Chwen et al ; 2010)** pour la présure et EEB Bacillus velezensis **(Boumadiene et al ; 2021)** et supérieur par rapport **(Carolina ; 2010)(Voire le tableau 10).**

II -**Résultats de l'extraction de l'extrait enzymatique d'origine animal (EEBa)**

Tableau 11 : caractéristique de l'extrait enzymatique

Paramètre	Valeur
Unité de présure UP (ml)	0.52
Force coagulante US	1/121.21
Teneur en protéine g/l	37.5
Activité spécifique (UP/ml)	121.33
Couleur	Transparente
Texture	Liquide

L'extrait enzymatique brut obtenu est de couleur transparente, il est liquide et présente une odeur caractéristique de caillette de caprin.

1-Activité coagulante

L'extrait enzymatique clarifié obtenu à partir de la caillette caprine a permis l'obtention d'un temps de floculation de 192 s (3.20min) sur **substrat de Berridge**. Ce temps nous a permis de calculer l'activité coagulante, égale à 0.52 UP/ml .Cette activité coagulante est inférieur à celle trouvée pour le présure commerciale qui a pris un temps de floculation, avec une activité coagulante égale à 2.963 UP/ml. Suivant la même méthode de mesure de l'activité coagulante**, (Boudjenah et al ; 2012)** ont trouvé une activité coagulante (AC) de 0,41 avec une concentration de 1,64 mg/ml pour une préparation enzymatique issue de caillette d'un dromadaire adulte. **(Isselnane et al ; 2016)** ont indiqué un AC de 3,91 avec l'extrait brut d'un dromadaire adulte ayant une quantité de protéines de 30 mg.

2-La force coagulante

La force coagulante de notre extrait enzymatique brut obtenu à partir de caillette de caprin est de 1/121.21. Cette valeur est largement inférieure à celle rapportée par la présure commerciale est de 1/50000.et elle est inférieures à celle que trouvée par **(Boumediene ; 2013)** et **(Bouloussa et Mahmoudi ; 2020).**

3-Activité protéolytique

Nous remarquons que l'EEBa est caractérisé par une activité protéolytique relativement faible ECD7 qui est 1.776 (extrait coagulant dromadaire 7 mois) et ECD14 qui est 1.179 (extrait

coagulant dromadaire 14 mois) et similaire à celle de ECD6 (extrait coagulant dromadaire 6 ans) qui est de l'ordre 0.887 (**Boudjenah ; 2011).**

4-Indice AC/AP

L'activité spécifique (exprimée en UP/mg) est le rapport entre l'activité coagulante et le taux de protéines de cet extrait enzymatique. L'activité spécifique de notre extrait est évaluée à 0.520 UP/mg, cette valeur est inférieure à celle du (**Siar ; 2014)** qui est 0,92 UP/mg et de **(Nouani et al ; 2011)** qui est 1,85 UP/mg .

Dosage des protéines de l'extrait enzymatique

Les résultats obtenus de dosage de taux de protéines dans les extraits étudiés est déterminé en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec la BSA dans les mêmes conditions opératoires **(Annexe III)** .

D'après les résultats obtenus dans la présente étude la teneur en protéines la plus élevée est retrouvée dans l'extrait enzymatique de caprin avec une valeur de 37.5 mg/ml suivi par l'extrait microbienne (7.5 mg/ml). Le taux de protéines retrouvé dans l'extrait de présure commercial est le plus faible avec une moyenne de 2.09 mg/ml.

5.les conditions optimales de l'activité coagulante

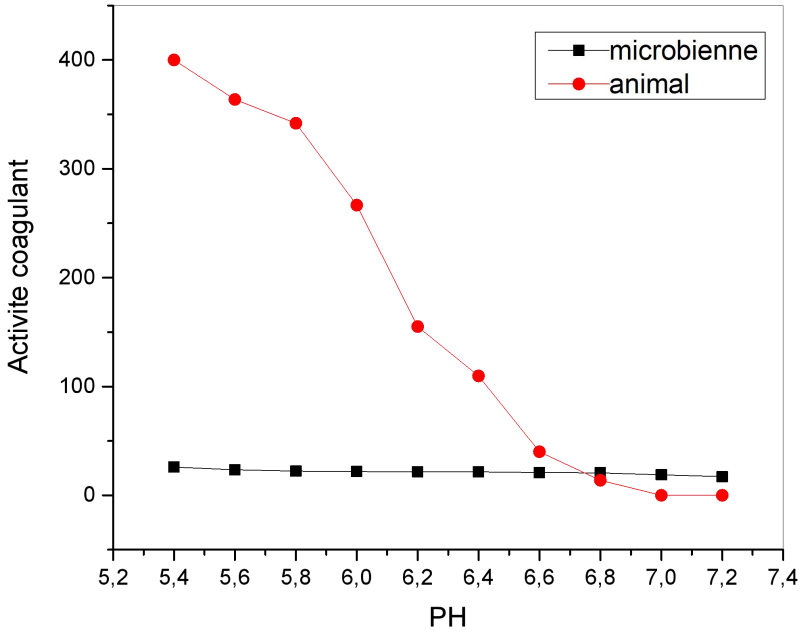


Figure 18 : influence du pH du lait sur l'activité coagulante relative de l'extrait enzymatique microbien et animal

L'activité coagulante est examinée dans le gradient de pH allant de 5.4 à 7.2 avec un pallier de 0.2. L'observation de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique n'a pu se faire qu'à partir d'un pH de 5.4, car en dessous de ce pH, le lait coagule avant l'addition de l'extrait enzymatique (coagulation acide). Cependant, l'activité maximale a été observée à pH 5,4. Au-delà de ce pH on observe une chute graduelle de l'activité coagulante, puis elle s'annule au pH de 7.2.

Selon **(He et al ; 2011),** l'activité coagulante optimale de l'enzyme obtenue à partir de la souche *Bacillus amyloliquefaciens D4* est à pH de 5.5, puis elle est inactivée à pH de 8, ce qui se concorde avec nos résultats. **(Pant et al ; 2015)** ont trouvé une activité optimale à pH 7,4 pour la protéase issue de *Bacillus subtilis*. Ainsi**, (Bey et al ; 2018)** ont montré que le pH optimal est de 6,4 pour l'extrait enzymatique de *Foeniculum vulgare* ; **(Schieh et al ; 2009)** et **(Li et al ; 2012)** ont trouvé une activité optimale à pH 5.7pour la protéase issue de *Bacillus subtilis natto* et **(Zhang et al ; 2019)** pour *Bacillus licheniformis BL312*

(Gamout et martin ; 1980) ont signalé que le PH d'activité de la présure animale est compris entre 5.3 et 6.3, son optimum d'action est à PH 5.8, elle est inactivée à PH 7.5 et dénaturé à PH 8.0. Selon ces mêmes auteurs, La vitesse d'action de la présure et de la pepsine bovine croit en fonction de l'abaissement du pH. Au PH 6.8, l'activité de ces deux enzymes est minimum

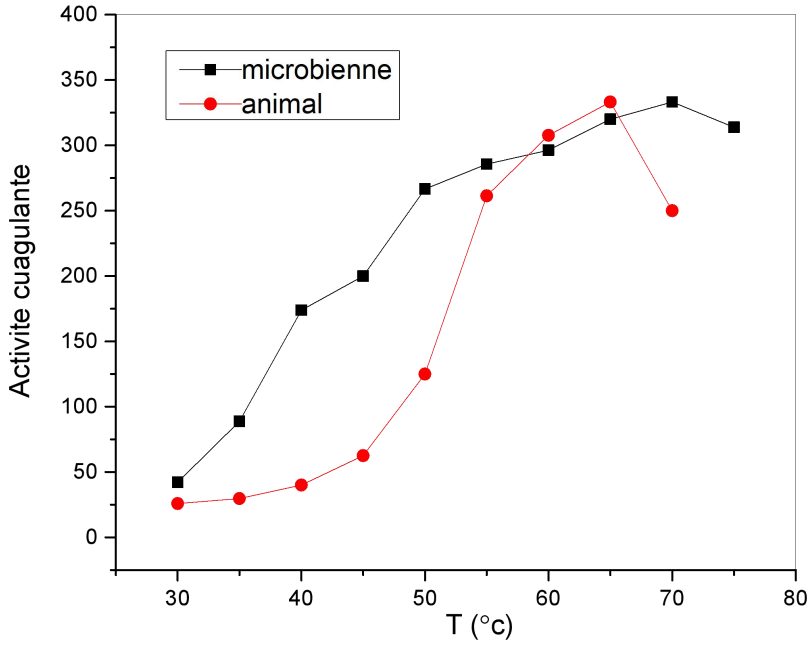


Figure 19 : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante relative de l'extrait enzymatique microbien et animal

La détermination de la température optimale du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut (EEB) de la souche *Bacillus sp* a été étudiée à des températures allantes de 30°C à 80°C par un palier de 5°C.

Les résultats obtenus lors de notre expérimentation font apparaitre que l'activité coagulante augmente progressivement avec l'élévation de la température pour atteindre son optimum au voisinage de 75°C pour EEB m et 65 °C pour EEBa. Au-delà de 75°C on note une baisse rapide de l'activité coagulante, puis s'annule à 80°C (inhibition totale de l'enzyme).

La valeur de température optimale de notre extrait enzymatique brut est identique à celle rapportée **(Ahmed et Helmy ; 2012)** pour la souche *Bacillus licheniformis 5A5*. **(Pant et al ; 2015)** ont observé une activité optimale chez *Bacillus subtilis* à une température de 50°C. Ainsi, **(Poza et al ; 2003)** ont enregistré une température optimale à37°C pour la protéase de

Myxococcus xanthus. Cependant une température optimale de 60°C est observée chez la protéase *Rhizopus ryzae*, *Penicillium oxalicum* et *Cryptococcus albidus* **(Kumar et al ; 2005).** En général, les extraits enzymatiques d'origine animale ont une activité importante à des températures modérés cependant les coagulases d'origine microbienne et végétale se montrent plus actives aux températures élevées **(Talantikite ; 2015).**

D'après les résultats de **(Slamani ; 2003)** et **(Outaleb ; 2006)**, l'activité optimale d'un extrait enzymatique purifié de la pepsine ovine est de 52°C avec une inactivation complète à 62°C, (**Agoune et Amrane ; 2007**), ont enregistré lors de leur caractérisation de l'extrait coagulant caprin, que l'activité coagulante s'accroit graduellement et elle est maximale à 46°C **(Bengana ; 2001)** a trouvé que l'optimum d'activité pour la chymosine et la pepsine bovine est à 45°C.

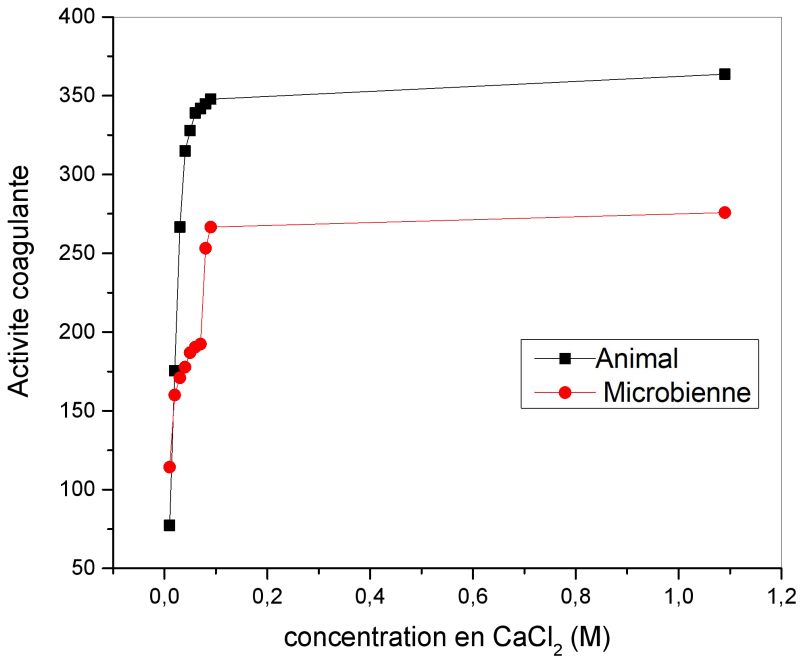


Figure 20 : Influence de la concentration en CaCl2 du lait sur l'activité coagulante relative de l'extrait enzymatique microbien et animal

La concentration du calcium ionique dans le lait est corrélée avec les propriétés de sa gélification, où une concentration plus élevée en cet élément aboutit à des temps de gélification plus courts et une plus grande résistance et fermeté des gels **(Glantz et al ; 2011).** Pour étudier l'influence du calcium sur l'activité coagulante de la protéase de Bacillus sp, le calcium a été ajouté au lait sous forme de chlorures de calcium CaCl2, tout en faisant varier la concentration de ce dernier de 0.01 à 0.1 M.

Les résultats illustrés par la figure n°20 montrent que l'activité coagulante de la protéase croit avec la concentration en CaCl2 jusqu'à atteindre une valeur optimale de l'ordre de 0.1 M pour le présure animal et microbienne.
En outre, **(Ding et al ; 2011)** et **(Zhang et al ; 2019)** ont rapporté une activité optimale de 50 mM pour les protéases de *Bacillus subtilis B1* et *Bacillus licheniformis BL312* respectivement. En effet, les enzymes d'origine microbienne sont les plus sensibles à la baisse des concentrations en $CaCl_2$.
(Nouani et al ; 2009) ont trouvé que l'optimum d'activité pour la préparation coagulante purifiée de poulet est de 0.02 M tandis que pour l'extrait enzymatique de limon et de la présure animale, l'optimum d'activité est marqué à 0.04 M. Au-delà de ces deux optimums, l'activité coagulante baisse, ces résultats confirme ceux obtenus dans nos essais.

Selon **(Temiz et al ; 2007)**, l'activité coagulante de la pepsine de dinde est optimale à une concentration en $CaCl_2$ de 0.035M. Ce résultat corrobore celui obtenu par l'EEB de dinde ce qui laisse suggérer la présence de pepsine dans notre extrait enzymatique.

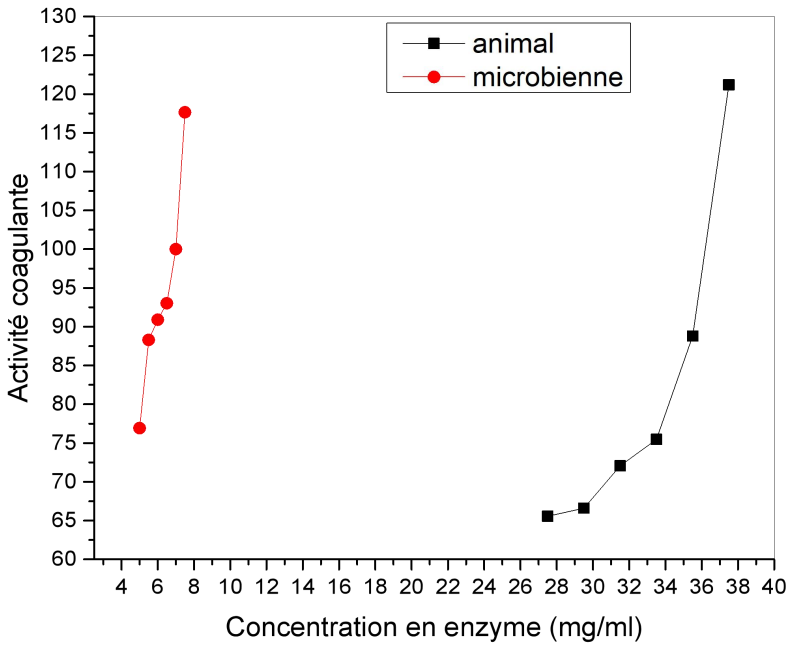


Figure 21 : influence de la concentration en enzyme du lait sur l'activité coagulante relative de l'extrait enzymatique microbien et animal

L'activité des extraits coagulants, en fonction de la concentration en extrait, a été estimée en mesurant le temps de coagulation pour des concentrations variables en protéines de l'extrait de 5 mg/ml à 7.5 mg/ml pour la présure microbienne et 27.5 mg/ml à 37.5 mg/ml pour présure animal.

Les résultats représentés par la figure n°21 montrent une augmentation progressive de l'activité coagulante au fur et à mesure de l'accroissement des concentrations de l'extrait. Cependant, dans l'intervalle de concentration testé, nous n'avons pas observé de pallier correspondant à une concentration saturante en enzyme. Auparavant, **(Van Hooydonk et Walstra ; 1987)** et **(Payens et al ; 1977**) considèrent que le temps de coagulation est en fonction de la concentration enzymatique.

(Belhamiche ; 2005), nota un accroissement de l'activité coagulante en fonction de la concentration en extrait enzymatique fongique, cependant dans l'intervalle de concentration allant de 0.25 à 0.3 mg /ml, elle nota un pallier de saturation en enzyme ce qui n'est pas le cas pour la présure en raison des faibles concentrations utilisées.

Ce résultat coïncide avec celui **(Meziane ; 2008)** qui a observé cette proportionnalité entre l'activité coagulante et la concentration en extrait enzymatique du poulet, du poisson et de la présure, sans pallier de saturation dans l'intervalle de concentration utilisée.

II. Essai de fabrication d'un fromage frais

1. Résultats d'analyses physico-chimiques du lait

Les résultats d'analyses physico-chimiques sont résumés dans le tableau suivant

Tableau 12 : les paramètres physico-chimique de lait de caprin

Les paramètres	Le lait caprin	La norme AFNOR (FAO ; 1995)
pH	6.60	7.7
Acidité °D	16	14-18°D
Densité	1031	1027-1035
MG g/l	55	41 g/l
EST g /l	148.615	136-140 g/l

Le lait analysé avant pasteurisation présente une composition de qualité et une fraîcheur apparente, conformes aux normes de fraîcheur définies par la norme AFNOR (1995).

2. Analyses physico-chimiques du fromage élaboré type frais et le rendement fromager

a. Analyses physico-chimiques du fromage

Nous avons élaboré 3 types de fromages frais référenciés comme suit :

Fa : fromage élaboré à partir de EEBa

Fm : fromage élaboré à partir de EEBm

Fc : fromage élaboré à partir de la présure commerciale

La composition physico-chimique des trois fromages élaborés est indiquée dans **le tableau 12**.

Tableau 13 : a composition physico-chimique des trois fromages élaborés

Propriétés physico-chimique	pH	MG g/l	EST g/l	MG/EST	ESD g/l	Rdt (%)
Fa	4.84	43	349.7	12.29	306.7	12.14
Fm	4.55	30	304.4	8.81	274.4	14.63
Fc	4.95	35	275.4	12.70	240.4	17.29

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois types de fromage. De plus, le pH est un facteur crucial pour contrôler la croissance bactérienne dans le fromage Il est important de noter que le pH est lié à la qualité du fromage : un pH de 5,0 indique un fromage de bonne qualité, tandis qu'un pH supérieur à 5,2 correspond à un fromage qui se détériore plus rapidement **(Champagne et al ; 2003).** Ces valeurs est plus élevée de celle trouvée par **(Galotyri et al ; 2018)** (3.80) et faibles de celle trouvée par **(Kongo et al ; 2016)** (4.80-5.40).

La teneur en matière sèche des fromages fabriqués est Fa (349.7g/l) pour le fromage à la présure caprin, Par contre les résultats de fromage à présure microbienne Fm (304.4g/l) et le présure commerciale Fc (275.4g/l). On observe que le fromage à présure animal a une valeur plus élève que le fromage à présure microbienne et commerciale. Ces valeurs sont supérieures à celle trouvées par (**Barbosa et al ; 1976). (**62,1g/l ;61,7g/l) pour le fromage gruyère et **(Quynh my ; 2018-2019**) .(30.56 g/l)

b. Rendement fromager

Le rendement est la quantité de fromage obtenu à partir d'une quantité indiquée de lait. C'est le paramètre le plus important du point de vue économique dans l'industrie laitière **(Huppertz et al ; 2006 ; Bittante et al ; 2013).** Il reflète aussi le bon déroulement des conditions de fabrication. Les rendements obtenus pour les essais réalisés sont Fa 12.14 % pour les

fromages issus de la coagulation par présure caprin.et le présure microbienne Fm 14.63 %et dernier le présure commerciale Fc 17.29%. Notre rendement obtenu est nettement inférieur aux rendements des travaux similaires sur le fromage frais de caprin qui est de 17% (**Kouiniba ; 2007)** 25% **(Kalanzpoulus ; 2007)** et finalement de 27% (**Cruz ; 2007)**

3. Résultats des analyses microbiologiques :

Tableau 14 : résultats des analyses microbiologies de lait pasteurisé

	Essai 1	Essai 2	Essai 3	*Norme JO N°39 2017 UFC/ ML*	
				M	**M**
GAMT t à30°c	**00**	**00**	**00**	**10^4**	**10^5**
Entérobactériacea	**00**	**00**	**00**	**10**	
Salmonella	**Abs**	**Abs**	**Abs**	**Abs /25ml**	

Les résultats du contrôle microbiologique effectué sur le lait pasteurisé montrent les microorganismes recherchés :

Les germes aérobies mésophile totaux (GMAT) sont absents

Les *Entérobactériaceae* sont absents.

Les *Salmonella* sont absents.

Nous constatons que la contamination du lait par ces germes est nettement absente et que tous les échantillons présentent une conformité à la norme **(JORA N° 39-2017).** Leur absence signe une bonne hygiène au cours de pasteurisation et de bonne qualité microbiologique.

4. Résultats de produit fini

Tableau 15 : résultat des analyses microbiologiques du produit fini

Essai Germes recherché	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Norme JO n°39 2017 UFC/G	
				M	M
Escherichia coli	**00**	**00**	**00**	10^4	10^5
Staphylococcus aureus	**00**	**00**	**00**	10^3	10^4
Salmonella	**Abs**	**Abs**	**Abs**	**Abs /25g**	

Les résultats du contrôle microbiologique effectuent sur le produit fini fromage frais indique :

Une absence d'*Escherichia coli.*

Une absence de *Staphylococcus aureus.*

Une absence de *salmonella.*

Ces résultats sont conforment aux normes établies **JORA n°39 -2017**, Ceci traduit une bonne qualité microbiologique du produit fini « fromage frais ». La Boone qualité du produit fini est le résultat de la bonne qualité microbiologique de la matière première et au le maitrise du procède de fabrication et au nettoyage efficace des équipements utilisé.

III. Propriétés sensorielles des fromages

1. Résultats du test de dégustation

Les caractéristiques organoleptiques ont été évaluées à l'aide du test Quick Rank de Kramer et **(Kramer ; 1960).** Cette méthode est appréciée en calculant la moyenne des scores (notes attribuées par les 16 panélistes pour chaque lot) et la somme des rangs (classement selon le score des différents lots). La différence entre les différents lots (les trois fromages) est jugée non significative lorsque l'intervalle de rang total est compris entre 25 et 35, au seuil de probabilité de 5 %. Les résultats de l'analyse sensorielle portant sur les critères suivants : odeur, texture et le gout des fromages frais préparés avec l'EEBm et l'EEBa et la présure commerciale, sont présentés sous forme de tableau récapitulatif **(Tableau 15)** et d'histogrammes **(Figures 22,23,24).**

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

Fromage	Fa	Fm	Fc

Caractères	MS	SR	MS	SR	MS	SR
Gout	12.375	34	12	30	12.4375	28
Odeur	11.4375	37	11.9375	32	12.3125	31
Texture	14.25	22	13.25	36	14.0625	28

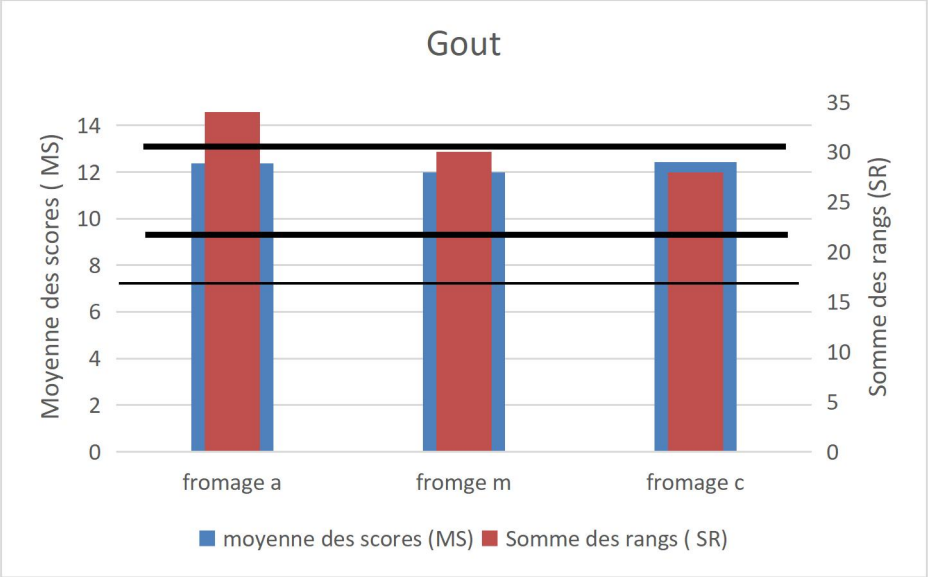


Figure 22:Histogramme d'analyse statistique du paramètre sensoriel (goût de la pâte) des différents fromages fabriqués

La somme des rangs (SR)des deux fromages microbien et commercial dans l'intervalle de signification [25,35], cela signifie qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux fromages. Cependant, pour le fromage animal la sommes des rangs se situe au-dessus de la limite supérieure de signification, il est donc statistiquement mauvais . De plus, **les moyennes des scores (MS)** nées pour les trois types de fromage ne présentent pas une grande différence et sont supérieures à limite acceptable.

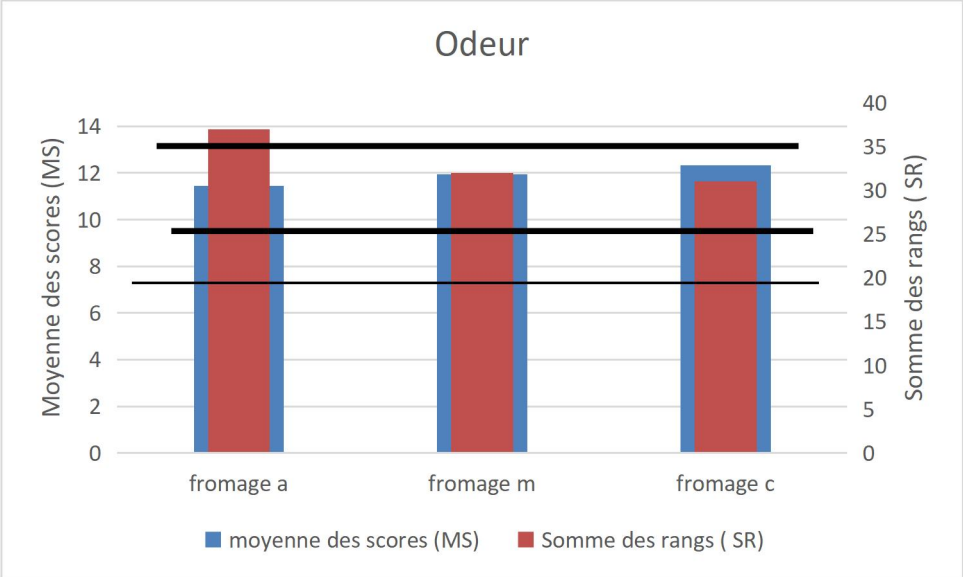


Figure 23:Histogramme des résultats des analyses d'odeur des fromages fabriqués

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

Selon **la moyenne des scores (MS)** ,l'odeur du fromage présure est la mieux appréciée par les panélistes avec un score égale à 12.3125 .

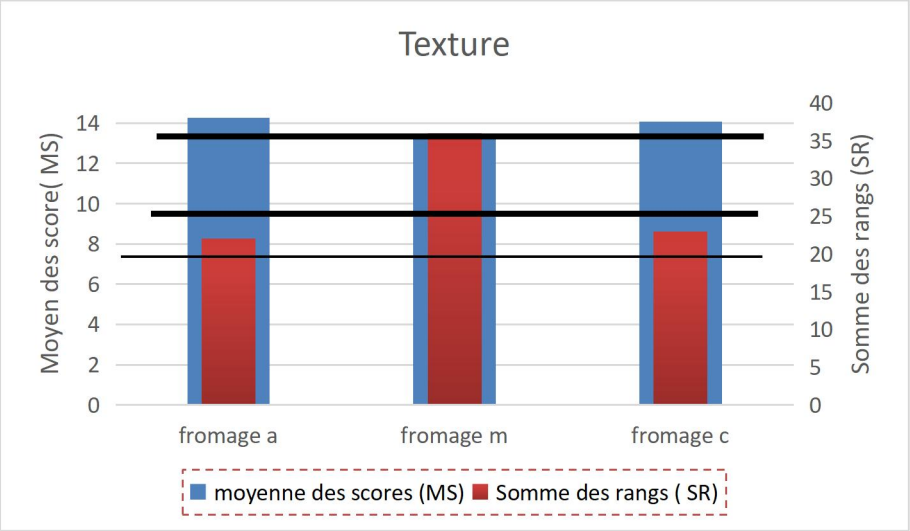


Figure 24:Histogramme des résultats des analyses du texture des fromages fabriqués

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

Par ailleurs,**la moyenne des scores (MS)** attribués au 2 fromages (14.0625,13.25) respectivement pour le fromage microbien et le fromage commercial indique que la texture n'est pas appréciée par l'ensemble des panélistes.

Conclusion

Conclusion :

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

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

Cette étude consiste à la fabrication d'un fromage frais, en utilisant un lait cru de chèvre en présence d'un agent coagulant extrait microbienne (Bacillus sp) et la présure animale. A travers cette étude, nous avons évalué les paramètres physico-chimiques et microbiologiques du lait de chèvre (matière première).

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut a été déterminée par la méthode de Berridge, sur les conditions standards (35°C ; pH =6 .4 ; 0.01 M de $CaCl_2$), en outre l'activité protéolytique a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre a une D.O de 660 nm.

Les résultats obtenus montré que les extraits enzymatiques bruts (EEB) présentent des activités coagulantes plus importantes; des activités protéolytiques fortes de 0.925 DO660 et 0.999 DO660 et des indices AC/AP de 127.18, 121.33 faible respectivement pour les protéases d'origine microbienne et animal.

Les paramètres influençant l'activité optimale de l'extrait enzymatique brut microbien ont été déterminés. L'activité optimale a été observée à une température de 75 °C, une concentration en $CaCl_2$ de 0.1 M et un pH de 5.4. Pour l'extrait enzymatique animal, l'activité optimale a été observée à une température de 65 °C, une concentration en $CaCl_2$ de 0.1 M et un pH de 5.4.

Les résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques ont montré que les fromages frais élaborés sont propres à la consommation et possèdent une qualité satisfaisante et conforme aux normes en vigueur

L'évaluation sensorielle des fromages a révélé une texture, une couleur et un gout satisfaisants pour chaque fromage.

Les résultats du rendement fromager de chaque fromage élaboré montrent que ce dernier est plus important pour le fromage préparé avec l'EEBc (17.29%) et le fromage préparé avec EEBm (14.63%) par rapport à celui fait à base de l'EEBa (12,14%).

Conclusion.....

L'évaluation sensorielle des fromages a révélé une texture et un goût satisfaisants pour chaque fromage. Cependant, l'odeur du fromage fait à partir de l'EEBa est Plus appréciée en comparaison avec les autres fromages.

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

➢ Optimiser les paramètres de production de l'enzyme (milieu de culture, taille de L'inoculum…)

➢ Purifier l'enzyme par l'emploi des différentes techniques de purification à savoir la chromatographie d'exclusion moléculaire.

➢ Déterminer le poids moléculaire et l'homogénéité protéique des protéases microbiennes par une électrophorèse sur gel poly acrylamide.

Références Bibiographiquees

Références Bibiographiquees.....

abdel-fattah a.f., el-hawwary n.m., amr a.s. 1974. studies on the production of milk-clotting enzymes, proteolytic enzymes and mucilage by fungi. microbiology, 84(2), 327–331.

ahmed m.u., rogers p.l. 1993. extracellular proteins of bacillus species. biotechnology advances, 11(1), 81–98.

alais c. 1974. principes des techniques laitières science du lait. 3e éd., paris, 513p.

amariglio s. 1986. contrôle de la qualité des produits laitiers. analyses physico-chimiques, 3e éd., afnor-itvs, france, 415p.

amimour m.m. ep. alioua. 2019. essais d'optimisation des procédés de fabrication des fromages traditionnels de qualité (j'ben).

andren a. 2021. milk-clotting enzymes. in: agents of change: enzymes in milk and dairy products, 349–362.

anthony lucas, edmond rock, jean-françois chamba, isabelle verdier-metz, patrick brachet, jean-baptiste coulon. 2006. respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest.

arwar a. 2019. change of proteolysis and sensory profile during ripening of cheddar-style cheese as influenced by a microbial rennet from rice wine. food science & nutrition [preprint].

balabanova t., vlaseva r. 2017. effect of rennet type and ripening period on chemical properties of bulgarian white brined cheese. international food research journal, 24(6).

barbara walther, alexandra schmid, robert sieber, karin wehrmuller. 2008. cheese in nutrition and health.

beckers j.f. 2005. résumé: la caractérisation des protéases aspartiques gastriques et la compréhension de leurs mécanismes d'activation.

Références Bibiographiquees.....

ben amira a., besbes s., attia h., blecker c. 2017. milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: a review. international journal of food properties, 20(sup1), 76–93.

bendimerad nahida. 2013. caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus dans l'ouest algérien. essai de fabrication de fromage frais type «jben».

bensmail s., nouar h., bouchenak k., fazouane-naimi f. 2013. étude de l'aptitude fromagère d'un extrait enzymatique coagulant produit par aspergillus niger ffb1. revue de microbiologie industrielle, sanitaire et environnement, 7(1), 98–119.

benyahia-krid f.a., aissaoui-zitoun o., boughellout h., adoui f., harkati a., siar e.h., zidoune m.n.e. 2016. chicken pepsin and rennet gels: internal bonds, rheology and microstructure. journal of veterinary science and technology, 7, 375.

berridge n.j. 1952. an improved method of observing the clotting of milk containing rennin. journal of dairy research, 19(3), 328–329.

bethelhem abebe, shimelis emire. 2020. manufacture of fresh cheese using east african calotropis procera leaves extract crude enzyme as milk coagulant.

bezie a., regasa h. 2019. the role of starter culture and enzymes/rennet for fermented dairy products manufacture – a review. nutrition and food science, 9, 21–27.

boudjenah-haroun s. 2012. aptitude à la transformation du lait de chamelle en produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de dromadaires. thèse de doctorat, université mouloud mammeri, tizi-ouzou, algérie.

boudjenah-haroun s., moulti-mati f., si ahmed s., mahboub n., siboukeur o.e., mati a. 2011. étude de la coagulation du lait de chamelle: utilisation des extraits gastriques de dromadaire à différents âges.

britten m., giroux h.j. 2022. rennet coagulation of heated milk: a review. international dairy journal, 124, 105179.

codex alimentarius. 2010. standard for camembert (codex stan c-33-1973). consulté en avril 2023.

creamer l.k. 1971. beta-casein hydrolysis in cheddar cheese evening. new zealand journal of dairy science and technology, 6, 91.

da silva r.r., duffeck c.e., boscolo m., da silva r., gomes e. 2019. milk clotting and storage-tolerant peptidase from aureobasidium leucospermi lb86. process biochemistry, 85, 206–212.

derouiche m., zidoune m.n. 2015. caractérisation d'un fromage traditionnel, le michouna de la région de tébessa, algérie.

evette. 1975. la fromagerie. paris : presses universitaires de france, 140p.

fao. 1995. le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. collection alimentation et nutrition, 2, 1–23.

faostat. 2018. alimentation et agriculture données. organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

farhat r. 2017. suivi de la survie de geotrichum candidum pendant la digestion in vitro du fromage type camembert.

fournier a. 2006. la vache. artémis, slovaquie, 97p.

fox p.f., guinee t.p., cogan t.m., mcsweeney p.l.h. 2017. fundamentals of cheese science.

fritze d. 2004. taxonomy of the genus bacillus and related genera. phytopathology, 94(11), 1245–1248.

gonzalez-rabade n., badillo-corona j.a., aranda-barradas j.s., del carmen salvador m. 2011. production of plant proteases in vivo and in vitro – a review. biotechnology advances, 29, 983–996.

guetouache m., guessas b. 2015. characterization and identification of lactic acid bacteria isolated from traditional cheese (klila). african journal of microbiology research, 9(2), 71–77.

guevara g.m., daleo g.r. 2018. biotechnological applications of plant proteolytic enzymes.

guillaume j., choubert g. 2001. digestive physiology and nutrient digestibility in fishes. in: nutrition and feeding of fish and crustaceans, 27–58.

hacène medjoudj, lamia aouar, mohammed nasreddine zidoune, ali adnan hayaloglu. 2017. proteolysis, microbiology, volatiles and sensory evaluation of algerian traditional cheese bouhezza made using goat's raw milk.

hachana y., aloui o., fortina r. 2021. use of caprifig tree extract as a substitute for calf rennet in goat's fresh cheese production. small ruminant research, 199, 106382.

hang f., wang q., hong q., liu p., wu z., liu z., hao z., chen w. 2016. purification and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase from paenibacillus spp. bd3526. international journal of biological macromolecules, 85, 547–554.

hui y.h. (ed.) 2006. food biochemistry and food processing. 1st ed., wiley.

irlinger f., mounier j. 2009. microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. current opinion in biotechnology, 2, 142–148.

isselnane s. 2014. caractérisation chromatographique et électrophorétique de l'extrait coagulant issu de caillettes de dromadaires adultes. mémoire de magister, université mouloud mammeri de tizi-ouzou, algérie.

isselnane s., boudjenah-haroun s., nouani a., si ahmed-zennias, bouazza b., yabrir b., mati a. 2016. molecular characterization of crude enzymatic extract from algerian camel abomasum (camelus dromedarius). emirates journal of food and agriculture, 28(3), 217–223.

jacob m., jaros d., rohm h. 2011. recent advances in milk clotting enzymes. international journal of dairy technology, 64, 14–33.

jeantet r., croguennec t., mahaut m., schuck p., brulé g. 2008. les produits laitiers. librairie lavoisier.

johnson m.e. 2001. food science and technology.

Références Bibiographiquees.....

kahlouche a., nouani a. 2017. characterization of a milk-clotting enzyme produced by bacillus mojavensis p47m strain isolated from algerian dairy farm soil.

kaminogawa s., dosako s., yamauchi k., kinoshita k. 1975. fluorescence polarization of as1-k-casein complex. agricultural and biological chemistry, 39(2), 533–539.

kumar a., grover s., sharma j., batish v.k. 2010. chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions.

law b.a., tamime a.y. (eds.) 2011. technology of cheesemaking. john wiley & sons.

logAN n.a., de vos p. 2009. bacillus. in: bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 3, the firmicutes, springer, 21–128.

logan n.a., vos p.d. 2015. bacillus. in: bergey's manual of systematics of archaea and bacteria, wiley, 1–163.

lowry o.m., rosebrough n.j., farr a.l., randall r.j. 1951. protein measurement with the folin phenol reagent. journal of biology chemistry, 193, 265–275.

luerce t. 2014. recombinant lactococcus lactis fails to secrete bovine chymosine. bioengineered [preprint].

majdi a. 2009. les fromages aop et igp. séminaire sur les fromages aop et igp, int-ingénieur agronomie, 88p.

manzoor a.s., mir s.a., paray m.a. 2014. plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review.

marilena esposito, prospero dipierro, winnie dejonghe, loredana marini, raffaele porta. 2016. enzymatic milk clotting activity in artichoke (cynara scolymus) leaves and alpine thistle (carduus defloratus) flowers.

martinez v. 2009. groupe d'étude des marchés de restauration collective et de nutrition (gemrcn). décision n°2009-03 du 30 juillet 2009 du comité exécutif de l'oeap.

moraes g.j., almeida l.c. 2020. protein digestion and proteolytic activity in the digestive tract of an amazonian freshwater fish. in: biology and physiology of freshwater neotropical fish, 251–271.

mr aridj taleb, mr belbachir boumediene. 2021. essai de fabrication de deux types de fromages (camembert et mozzarella) à base de lait inoculé avec mycélium de pleurotes.

nicosia f.d., puglisi i., pino a., caggia c., randazzo c.l. 2022. plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. foods, 11(6), 871.

nouani a., moulti-mati f., belbraout s., bellal m.m. 2011. purification and characterization of a milk clotting protease from mucor pusillus: method comparison. african journal of biotechnology, 10(9), 1655–1665.

osaana n. donkora, anders henriksson, todor vasiljevic, nagendra p. shaha. 2007. proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk.

ouarda aissaoui zitoun ép. hamama. 2014. fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnel algérien « bouhezza ».

outaleb t. 2006. aptitude à la coagulation du lait par la pepsine ovine. mémoire ingénieur agronome, institut national agronomique, el harrach, 54p.

palashoff m.h. 2008. determining the specificity of pepsin for proteolytic digestion. thèse doctorale, northeastern university.

parente e., cogan t.m. 2004. starter cultures: general aspects. in: cheese: chemistry, physics and microbiology, ed. fox p.f., mc sweeney p.l.h., cogan t.m., guinee t.p., elsevier, 123–148.

patel s., gupta r.s. 2020. a phylogenomic and comparative genomic framework. proposal for six new genera of bacillus species. international journal of systematic and evolutionary microbiology, 70(1).

poza m., sieiro c., carreira l., baross-velazquez j., villa t.g. 2003. production and characterization of the milk-clotting protease of myxococcus xanthus strain 422. indian journal of biotechnology, 30, 691–698.

raghunath t., mahajan g., chaudhari m. 2014. plant latex as vegetable source for milk-clotting enzymes and their use in cheese preparation. international journal of advanced research, 2, 1173–1181.

ramili a., ramli n.a., ahmad s.h. 2005. production and characterization of recombinant chymosin for cheese-making applications. journal of dairy science, 88(2), 1234–1242.

rao l.k., mathur d.k. 1975. studies on the production of bacterial rennet in a pilot plant fermentor. biotechnology and bioengineering, 17(9), 1349–1361.

remeuf f., cossi n., dervi n., tomasson r. 1991. relation entre les paramètres physico-chimiques du lait et son aptitude fromagère. tec & doc lavoisier, paris, 549p.

richonnet c. 2015. caractéristiques nutritionnelles des fromages fondus. edition elsevier masson, p. 9.

rogelj i., perko b., bogovic-matijasic b., rogelj j. 2001. prevalence of lactobacillus and bacteriocin production in lactic acid bacteria isolated from cheese. food technology and biotechnology, 39(2), 93–99.

roset g. 2019. coagulation et coagulation enzymatique en transformation fromagère. technique de l'ingénierie, 2, f4700.

saraswathy n., ganesh s., arpi j., meena c. 2013. production and optimization of protease from bacillus licheniformis ncim 2044. asian journal of pharmacy and life science.

scheldeman p., herman l., foster s., heyndrickx m. 2006. bacilles sporothermodurans et autres hautement sporulateurs résistants à la chaleur dans le lait. journal de microbiologie appliquée, 101(3), 542–555.

shah m.a., mir s.a., paray m.a. 2014. plant proteins as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. dairy science & technology, 94(1), 5–16.

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), 85–91.

siar e.h., zaak h., kornecki j.f., zidoune m.n., barbosa o., fernandez-lafuente r. 2017. stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose. process biochemistry, 58, 98–104.

siboukeur o., mati a., hessas b. 2005. amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait camelin (camelus dromedarius) : utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires.

silva b.l., geraldes f.m., murari c.s., gomes e., da-silva r. 2014. production and characterization of a milk-clotting protease from thermomucor indicae-seudaticae n31. applied biochemical and biotechnology, 172, 1999.

slamani r. 2003. optimisation d'une méthode d'extraction de la pepsine ovine. mémoire magister, institut national agronomique, el harrach, 43p.

sørhaug t., stepaniak l. 1997. psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products. critical reviews in food science and nutrition, 37(5), 387–409.

sorin nitu, mihaela geicu-cristea, florentina matei. 2021. milk-clotting enzymes obtained from plants in cheesemaking – a review.

szecsi p.b., harboe m. 2013. chymosin. in: handbook of proteolytic enzymes, vol. 1, ed. rawlings s.p., 37–42.

uniacke-lowe t., fox p.f. 2017. effect of chymosin/pepsin ratio on milk coagulation and physical properties. international dairy journal, 72, 32–40.

vignola c.l. 2002. science et technologie du lait, transformation du lait, vol. 11, 4e éd., p. 67.

walther b., schmid a., sieber r., wehrmuller k. 2008. cheese in nutrition and health. dairy science & technology, 405p.

watterson m.j., kent d.j., boor k.j., martin n.h. 2014. spore-forming bacteria in fluid milk: progress and prospects. dairy science & technology, 94(4), 409–431.

yao zhang, jiayun hu, xiaofeng liu, chunmin jiang, juan sun, xinjie song, yuanfeng wu. isolation and production optimization of a novel milk-clotting enzyme bacillus velezensis db219.

zhang z., qiao h., zhang w. 2021. enzyme properties of milk-clotting enzyme from a newly isolated bacillus licheniformis d3.1, 1(1).

zidoune m.n., adoui f. 2017. extraction d'enzyme coagulant de lait à partir de proventricules de poulet.

les Annexes

Annexes.....

Annexe 1 :

Coloration de Gram

❖ **Principe**

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactériennes, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classifier; les bactéries de Gram positif doté d'une simple paroi avec une grande quantité de peptidoglycane, des bactéries a gram négatif, composés de moins de peptidoglycane mais pourvues d'une membrane externe supplément.

❖ **Réactifs**

Violette de gentiane

Lugol

Alcool

La Rose de fuchsine

Huile d'immersion.

❖ **Mode opératoire**

•Réaliser un frottis

•Fixer le frottis par 02 ou 03 passages à travers la flamme du bec ben-zen

•Poser la lame sèche sur le porteur reposant sur un bac de coloration

•Verser le violet de gentiane sur le frottis, laisser le 1 min de réaction

•Rincer avec un filet d'eau ;

•Rincer avec le lugol, laisser le 30 sec ;

•Rincer avec un filet d'eau ;

•Rincer avec l'alcool, laisser le 5 sec ;

•rincer avec un filet d'eau ;

•Verser le rose de fuchsine, laisser le 30 sec de réaction ;

•Rincer avec un filet d'eau et sécher la lame ;

•Ajouter 2 gouttes d'huile d'immersion ;

•Déposer la lamelle sur la lame;

•Déposer l'ensemble sur le support du microscope optique ;

Observer au microscope optique pour un grossissement de x100.

Annexes.....

❖ **Conférence**

La couleur des bactéries est Violet donc ce sont des bactéries Gram positif (+), vu la Présence d'une paroisse épaisse qui maintient la couleur initiale de violet de gentiane;

La couleur des bactéries est rose donc ce sont des bactéries Gram négatif (-), vu la présence D'une parole fine par l'intervention du lugol et l'alcool; la couleur du violet disparaissait et se Couleur par le rose de fuchsine.

GRAM+

GRAM –

Annexes.....



Figure 1: les étapes de coloration de Gram

Annexes 2

Les tests biochimiques

❖ **Test catalase**

Mode opératoire

•Prélever une colonie isolée avec une pipette de pasteur boutonnée ;

•Déposer cette colonie sur une lame propre et sèche ;

•Ajouter une goutte d'eau oxygénée sur le dépôt.

❖ **Test oxydase**

Mode opératoire

•Prélever une colonie isolée du germe a rechercher a l'aide d'une pipette pasteur ;

•Déposer la colonie prélevée sur le support du test oxydase

Annexe 3

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

Les constituants du substrat de Berridge

➢ **Le lait en poudre**

Le lait en poudre utilisé est de type LOW-HEAT obtenu à d'un lait écrémé pasteurisé de bonne qualité bactériologique (moins de 5000 germes/ml). C'est une poudre n'ayant subi qu'un chauffage faible qui entraine un respect de l'état physicochimique de protéines solubles du sérum, elle est réservée dans des boites métalliques dans un endroit non humide.

➢ Solution de $CaCl_2$

La solution de $CaCl_2$ de qualité anhydre utilisée à une concentration de 0,01M, la solution est conservée à +4°C à l'obscurité.

➢ Mode opératoire

Pour préparer 100ml de substrat de Berridge, on dissout 12g de lait en poudre dans 100ml de $CaCl_2$ à0,01M. On verse une petite quantité de solution sur la totalité de la poudre de façon à obtenir par agitation manuelle une bouillé homogène, le reste de la solution $CaCl_2$ chlorure de calcium est alors ajoutée sur cette bouillé, puis agité par un agitateur magnétique douce pendant 30mn. Le pH du lait ainsi préparé est ajusté à pH=6,4 avec une solution de HCL 1N ou NaOH 1N. Le substrat est prêt l'emploi et conserver au réfrigérateur

Annexe 4

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

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

• **Solution A** : acétate de sodium ($C_2H_3O_2Na$) à 0.1 N (8.204g/l).

• **Solution B** : acide acétique à 0.1 N (6.005g/l).

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



Figure 2 : préparation de solution tampon

Annexe 5

Préparation de la courbe étalon BSA 1.

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

➢ **Solutions:**

• **Solution (A):** 5% Na2CO3.

• **Solution (B):** 0,5% CuSO4, 5H2O in Sodium- potassium tartrate à 1%.

• **Solution(C)** : 50 ml (A) + 2ml (B) (à préparer immédiatement) ; • Solution (D) : NaOH (1N)

• **Solution** (E) : réactif de Folin-Ciocalteau dilué ½

➢ **Mode opératoire**

• Courbe étalon Solution mère : BSA à raison de 200µg/ml dans l'eau distillée ;

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

▪ Le tube témoin contient 0,5 ml d'eau distillée.

▪ Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de la solution (D) puis 2,5ml de la solution (C) ; ▪ Laisser reposer pendant 10 mn ;

▪ Ajouter 0,5ml de la solution (E) ;

▪ Incuber pendant 30 mn à l'obscurité.

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

Lecture : au spectrophotomètre à 750 nm contre un blanc.

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

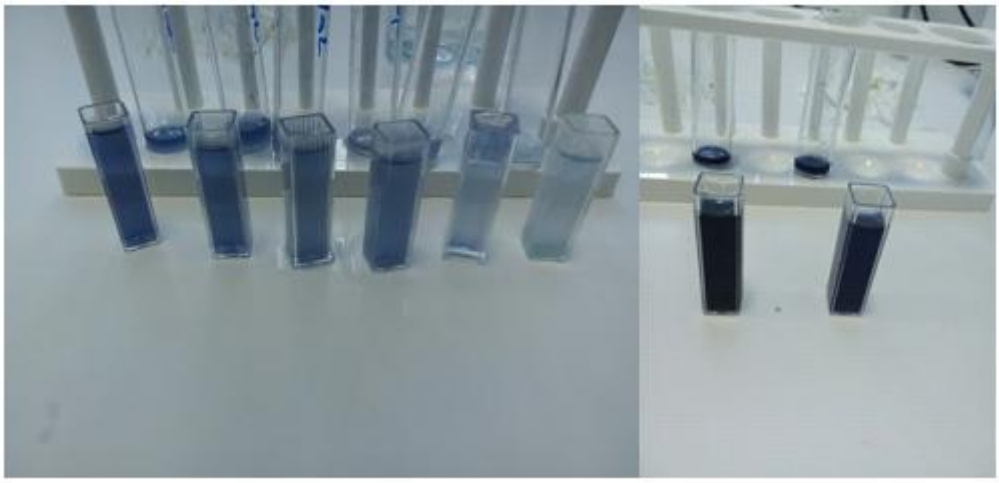


Figure 3 : mesurer l'absorbance des solutions pour préparer courbe d'étalonnage

2. A les différentes dilutions de la solution B.S.A**.**

2. B les deux cuves des EEB**.**

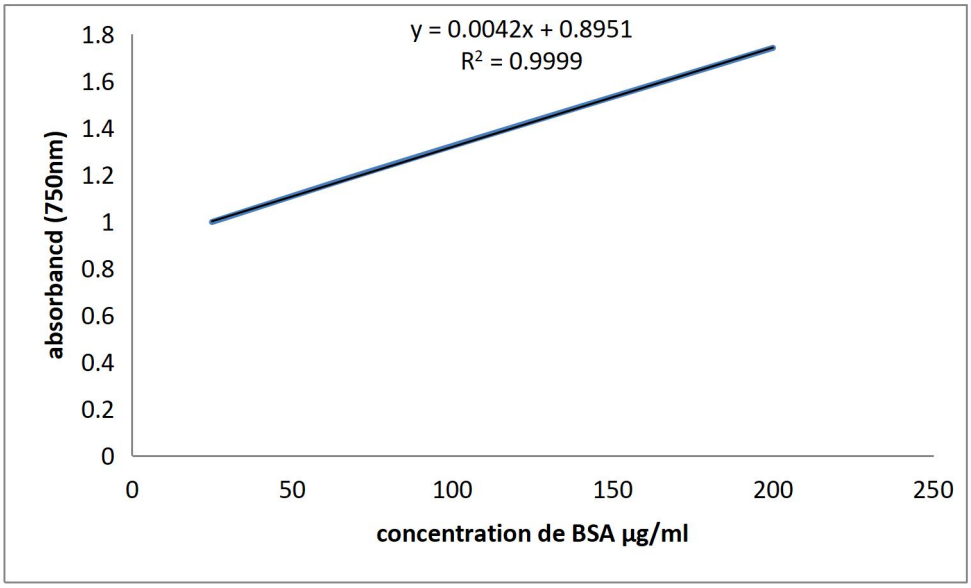


Figure 4: le courbe étalon de BSA

Annexe 6

Les analyses physicochimiques de lait

Détermination de l'acidité titrable

Mode opératoire

*Remplir la burette de la solution de NaOH N/9 et la fixer au statif, régler le niveau du liquide à zéro.

*A l'aide de la pipette 10ml, prélever 10ml de lait et transférer dans un bécher de 100ml.

*Ajouter 3-4 gouttes de solution de phénolphtaléine et titrer jusqu'à apparition d'une couleur rose persistante.

*Noter le volume de solution titrant utilisé en dixièmes de millilitres

*Nombre de dixièmes de millilitres de NaOH=°D.

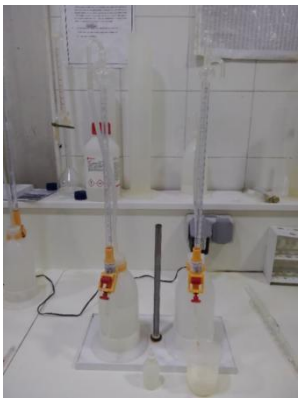


Figure 5: mesure d'acidité du lait

Détermination de la teneur en matière grasse

Mode opératoire

-introduire 10ml d'acide dans le butyromètre, ne pas mouiller le col

-Ajouter 11ml de lait à l'aide d'une pipette sans mouiller le col et en évitant un mélange prématuré entre le lait et l'acide

-Verser à la surface du lait 1ml d'alcool iso amylique, boucher ensuit avec soin le butyromètre, agiter avec précaution mais rapidement jusqu'à disparition des grumeaux, le remettre à sa position initial et attendre que l'ampoule soit remplie, retourner et attendre que l'ampoule soit complètement vidée, après six retournements successif, l'agitation ne pas laisser refroidir le butyromètre, et si nécessaire le réchauffer au bien d'eau à 65°C

- Centrifuge 5 min, au sortir de la centrifugation, modifie s'il y a lieu le réglage du bouchant pour que la phase liquide se situe dans l'échelle graduée

- Plonger le butyromètre verticalement, bouchon en bas dans le bain d'eau et laisser 5min, le niveau doit recouvrir l'ampoule terminale du butyromètre



Figure 6 : mesure taux de matière graisse du lait

Mode opératoire

*Verser doucement le lait dans une éprouvette tenue inclinée, afin d'éviter la formation de mousse.

*Remplir l'éprouvette jusqu'à ras bord de matière que le lait déborde légèreme. pour entrainer les traces de mousse qui pourrait gêner la lecteur.

*Plonger le thermo lactodensimètre dans le lait en le retenant jusqu'au voisinage de l'équilibre.



Figure 7: détermination de la densité du lait

Détermination de l'extrait sec totale (la matière sèche totale)

Mode opératoire

*Dans une coupelle en aluminium, séchée et tarée, peser 1gr ±0.1 de produit à analyser Etaler sur toute la surface de la coupelle en faisant attention de ne pas toucher les bords de celle-ci.

*Mettre la coupelle dans la thermo balance et la mettre en marche en baissant le couvercle et en appuyant sur TAR**.**

Détermination du pH

Mode opératoire

*Etalonner le pH mètre à l'aide des deux solutions tampon à pH =4±0.1 et pH=7±0.1.

*Régler la température de l'appareil à 20°C.

*Introduire l'électrode dans le récipient contenant l'échantillon.

*Attendre la stabilisation du pH pour effectuer le lecteur.



Figure 8: Détermination de pH de lait

Détermination de la température

Mode opératoire

Un thermomètre est plongé pendant 2 mn dans un bêcher contenant 50ml de lait.

Annexe 7

Analyse physicochimique de fromage

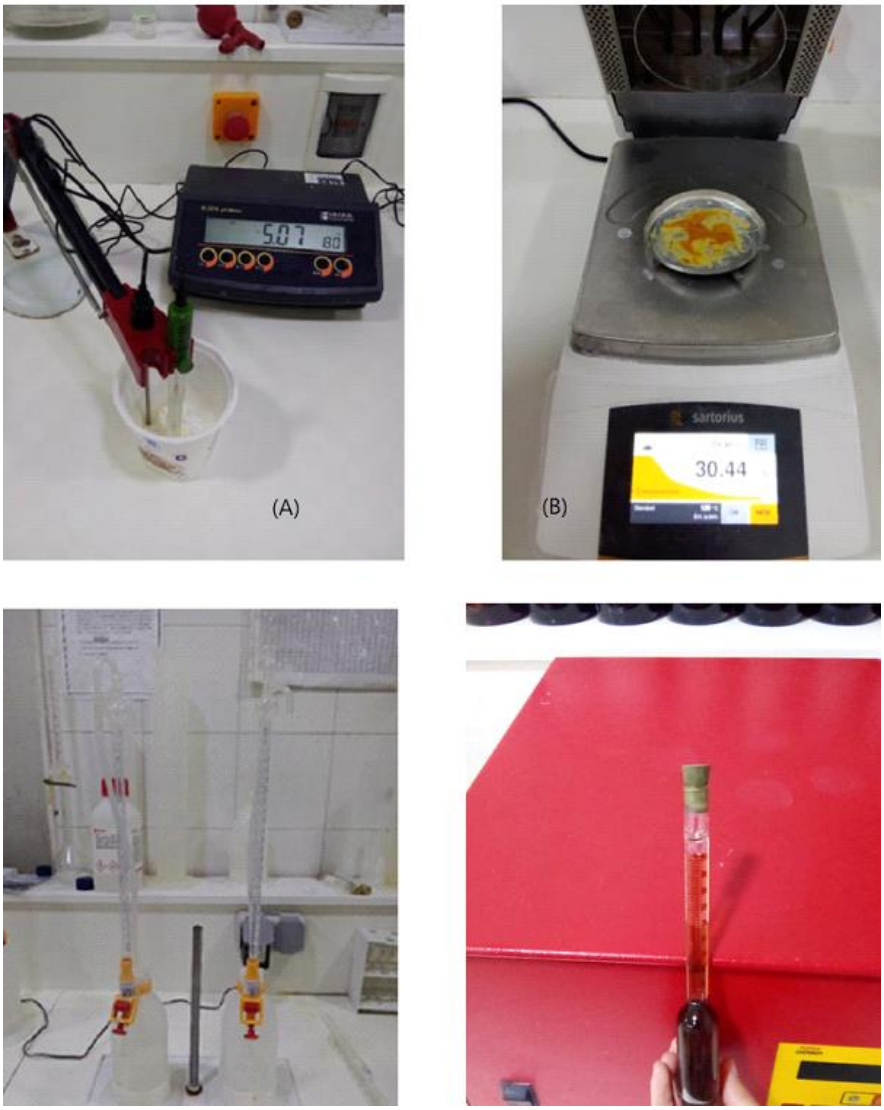


Figure 9: mesure des paramètres physicochimiques de fromage

Annexes.....

A. Détermination de pH de fromage

B. mesuré l'extrait sec total de fromage à l'aide de dessiccateur

C. Mesuré l'acidité du fromage

D. Mesuré le taux de matière graisse

Annexe 8

Les analyses microbiologiques

- **Préparation de la dilution mère :**

*Ajouter 225 ml de diluant et Mélanger.

Cette opération est plus facilement réalisée dans l'homogénéisateur de type péristaltique.

On peut également travailler uniquement sur la phase aqueuse pour la dilution.

*Placer le récipient dans un bain d'eau à 45 °C ± 1 jusqu'à ce que le beurre soit fondu. Bien mélanger et laisser séparer pendant 15 min. au maximum.

*Si nécessaire, pour séparer les phases, placer l'échantillon pour l'essai fondu dans un tube à centrifuger stérile (ou faire fondre l'échantillon pour essai directement dans le tube), et centrifuger à une fréquence de rotation de 1000 t/min à 2000 t/min.

*Éliminer stérilement la phase grasse (supérieure) avec un tube stérile relié à une pompe à vide.

* Prélever la couche inférieure.

- **Préparation des dilutions décimales suivantes :**

*Dans le cas de la recherche de la présence ou de l'absence d'un micro-organisme dans 0,1ml ou 0,1 g de produit, il n'est pas nécessaire de préparer les dilutions décimales.

*Introduire avec une nouvelle pipette 1 ml de la dilution primaire dans un nouveau tube contenant 9 ml de diluant stérile en évitant le contact de la pipette avec le diluant. Utiliser une nouvelle pipette pour chaque dilution.

Annexes.....

*Dans la pratique courante, quand on exige une dilution10-3, 1 ml de la dilution primaire devrait être rajouté à 9 ml de diluant stérile

*Mélanger soigneusement, soit par aspiration refoulement, 10 fois, avec une nouvelle pipette, soit en utilisant un agitateur mécanique pendant 5 à 10 secondes pour obtenir la dilution 10-2.

*Si nécessaire, répéter ces opérations avec un diluant stérile en utilisant la dilution 10-2 et les suivantes pour obtenir les dilutions 10-3, 10-4, etc. Jusqu'à obtention du nombre approprié de micro-organismes par millilitre

. Recherche et dénombrement des G A M T

Mode opératoire :

A partir des dilutions décimales allant de 10-3 à 10-1, porter aseptiquement 1 ml dans une boîte de pétri vide préparée à cet usage et numérotée.

Compléter ensuite avec 12 à 15 ml de gélose PCA fondue puis refroidie à 45 °C ± 1. Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de (8) pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose utilisée. Laisser solidifier sur la paillasse, puis rajouter une deuxième couche d'environ 5 ml de la même gélose, cette double couche à un rôle protecteur contre les contaminations diverses**.**

Mode opératoire

Préparation du milieu d'enrichissement

Au moment de l'emploi, ouvrir aseptiquement le flacon contenant le milieu Giolitti Cantoni pour y ajouter 15 ml de la solution de Tellurite de potassium. Mélanger soigneusement. Le milieu est alors prêt à l'emploi.

Enrichissement

A partir des dilutions décimales retenues, porter aseptiquement 1 ml par dilution dans un tube à vis stérile. Ajouter par la suite environ 15 ml du milieu d'enrichissement. Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Recherche de Salmonella

Mode opératoire :

La recherche de Salmonella nécessite une prise d'essai à part.

Annexes.....

- Pré-enrichissement

Mettre 25 g de produit à analyser dans un flacon de 225 ml de TSE et bien homogénéiser. Incuber à 37 °C pendant 18 h

- Enrichissement

L'enrichissement doit s'effectuer sur deux milieu sélectifs différents à savoir que :

- le milieu de Rappaport Vassiliadis réparti à raison de 10 ml par tube,
- le milieu de Sélénite Cystene réparti à raison de 100 ml par flacon.

L'enrichissement proprement dit, se fait donc à partir du milieu de pré-enrichissement de la façon suivante :

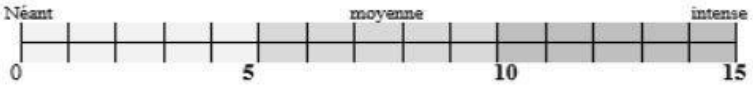
- 0,1 ml pour le tube de Rappaport Vassiliadis,
- 10 ml pour le flacon de Sélénite Cystene.

Annexe 9

Analyse des descripteurs sensoriels d'un fromage frais

Nom/ Prénom : Promotion Date :

Il vous est demandé d'évaluer les caractéristiques du fromage en donnant une note de 0 à 15 (Aspect/texture, Odeur/Arôme, Goût) selon l'échelle et les caractéristiques proposées. Veillez analyser les fromages par ordre. Model d'échelle :



Aspect et texture fromage						
	Texture uniforme-lisse	Texture rugueuse	Texture sableuse	Texture tartinable	Texture crémeuse	Texture pâteuse
FM1						

Odeur du fromage : Flairez et notez rapidement l'intensité de l'odeur					
	Odeur lactique	Odeur animale	Odeur d'herbe	Sans odeur	Autres à préciser
FM1					

Gout et arôme du fromage : Mastiquez l'échantillon puis évaluez l'intensité des saveurs					
	Acide	Salé	Doux	Amer	Gout de beurre
FM1					

	Appréciation globale du fromage					
	Mauvais	**moyen nement bon**	**Bon**	**très bon**	**riche en arômes (oui/non)**	**durée de l'intensité dans la bouche***
FM1						

Figure 10: Fiche de dégustation

Annexes.....



Figure 11 : Les échantillons du fromage frais présentés le jour du test de dégustation

Annexe 10

Les paramètres sensoriels du fromage

Tableau 1 : Texture

	Fm		Fa		Fc	
Panélistes	**Score**	**rang**	**score**	**rang**	**score**	**Rang**
1	**13**	**3**	**15**	**1.5**	**15**	**1.5**
2	**13**	**3**	**14**	**1.5**	**14**	**1.5**
3	**14**	**3**	**14**	**3**	**14**	**3**
4	**8**	**3**	**14**	**1.5**	**14**	**1.5**
5	**14**	**2**	**13**	**3**	**15**	**1**
6	**14**	**1**	**13**	**2.5**	**13**	**2.5**
7	**15**	**3**	**15**	**3**	**15**	**3**
8	**12**	**3**	**14**	**1.5**	**14**	**1.5**
9	**9**	**3**	**15**	**1.5**	**15**	**1.5**
10	**13**	**3**	**13**	**3**	**13**	**3**
11	**13**	**2.5**	**13**	**2.5**	**14**	**1**
12	**15**	**1.5**	**15**	**1.5**	**10**	**3**
13	**15**	**3**	**15**	**3**	**15**	**3**
14	**15**	**3**	**15**	**3**	**15**	**3**
15	**14**	**2.5**	**15**	**1**	**14**	**2.5**
16	**15**	**3**	**15**	**3**	**15**	**3**
Moyennes des scores	**13.25**		**14.25**		**14.0625**	
Sommes des rangs	**36**		**22**		**23**	

Annexes.....

Tableau 2 : Odeur

	Fm		Fa		Fc	
Panélistes	**Score**	**rang**	**score**	**rang**	**score**	**rang**
1	**10**	**3**	**15**	**1**	**14**	**2**
2	**14**	**1**	**13**	**2**	**10**	**3**
3	**12**	**3**	**12**	**3**	**12**	**3**
4	**15**	**1.5**	**15**	**1.5**	**14**	**3**
5	**12**	**1.5**	**10**	**3**	**12**	**1.5**
6	**15**	**1.5**	**9**	**3**	**15**	**1.5**
7	**12**	**3**	**14**	**1.5**	**14**	**1.5**
8	**8**	**2.5**	**9**	**1**	**8**	**2.5**
9	**14**	**3**	**14**	**3**	**14**	**3**
10	**14**	**3**	**14**	**3**	**14**	**3**
11	**11**	**3**	**11**	**3**	**11**	**3**
12	**12**	**3**	**12**	**3**	**12**	**3**
13	**10**	**2**	**5**	**3**	**13**	**1**
14	**7**	**2**	**5**	**3**	**9**	**1**
15	**12**	**3**	**12**	**3**	**12**	**3**
16	**13**	**3**	**13**	**3**	**13**	**3**
Moyennes des scores	**11.9375**		**11.4375**		**12.3125**	
Sommes des rangs	**32**		**37**		**31**	

Tableau 3 : Gout

	Fm		Fa		Fc	
Panélistes	**Score**	**Rang**	**Score**	**Rang**	**Score**	**Rang**
1	**14**	**3**	**14**	**3**	**14**	**3**
2	**13**	**2**	**14**	**1**	**12**	**3**
3	**10**	**2**	**13**	**1**	**6**	**3**
4	**11**	**3**	**15**	**1**	**14**	**2**
5	**8**	**2**	**5**	**3**	**13**	**1**
6	**13**	**3**	**15**	**1.5**	**15**	**1.5**
7	**13.5**	**2**	**13**	**3**	**14**	**1**
8	**14**	**3**	**14**	**3**	**14**	**3**
9	**9**	**1**	**6**	**3**	**7**	**2**
10	**14**	**3**	**14**	**3**	**14**	**3**
11	**14**	**3**	**14**	**3**	**14**	**3**
12	**13**	**1.5**	**12**	**3**	**13**	**1.5**
13	**12**	**3**	**12**	**3**	**12**	**3**
14	**15**	**1.5**	**13**	**3**	**15**	**1.5**
15	**10**	**2.5**	**10**	**2.5**	**12**	**1**
16	**10**	**2.5**	**14**	**1**	**10**	**2.5**
Moyennes des scores	**12**		**12.375**		**12.4375**	
Sommes des rangs	**30**		**34**		**28**	

Tableau 4 : Appréciation globale du fromage

	Mauvais	Moyennement bon	Bon	Très bon
Fm		X		
Fa				x
Fc			x	











Figure 12 : Les appareilles