

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de la Recherche Scientifique

Université IBN KHALDOUN-Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière : "Sciences Biologiques"

Spécialité : "Microbiologie Appliquée"

Comparaison entre trois techniques de coagulation mixte d'un fromage frais.

Présenté et soutenu publiquement le 27/06/2018 par :

M^{lle} .KESRI Nadia

M^{lle} KHELIFA Bakhta

M^{lle} MAROUF Widad

Devant le Jury:

President: Mr. ACEM K. MCA

Promotrice: M^{lle} MOULAY M. MCA

Co-promoteur: Mr. BENBEGUARA M MAA

Examinatrice: M^{lle} MEDJEBER N. MCB

Année universitaire: 2017-2018

Dédicace

Je dédie ce modeste travail en signe de reconnaissance,

A mes chères parents avec tous mes respects et ma tendresse et avec tout l'amour que je leurs porte et qui trouve ici toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude, pour leurs aide, soutien et encouragement.

Que dieu les garde et les protège et leurs accorde une longue vie ;

A mes frères : Ahmed, Aissa, Ali, Feteh ;

A mes sœurs : Kheira, Dhawya, Zohra, Amina, Meriem, Ghania ;

A mes nieces : Hayet, Chaima, Nourhan, Aya, Ibtihal et Rana.

A mes enseignants : Mr Benbeguara, Mr Hadj Said, Mr Hocine et surtout au docteur Moulay M. pour m'avoir donné l'esprit de compétence.

A mes chères amis Widad, Bakhta et Attallah, Mohamed et Mohamed, qui ont partagé avec moi les moments difficiles de ce travail.

A tous ceux qui ont participé pour terminer ce travail.

NADIA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail en signe de reconnaissance,

*A mon chère père (**Tayeb**) qui est à l'origine de ce que je suis.*

*A ma très chère mère (**Zohra**) qui est toujours sacrifiée pour mon éducation, qui ma entourée de son amour et de son affection, je la remercie et je n'oublierai jamais son soutien moral dans les moments les plus difficile*

Que Dieu les protège.

*A mes chère frères et sœurs particulièrement ma petite **Djamila**.*

*A mes enseignants : **Mr Benbeguara, Mr Hadj Said, Mr Hocine** et surtout au **docteur Moulay M.** pour m'avoir donné l'esprit de compétence.*

*A mes chères amis **Widad, Nadia et Attallah, Mohamed et Mohamed**, qui ont partagé avec moi les moments difficiles de ce travail.*

A tous ceux qui ont croisé de près ou loin mon chemin et qui m'ont permis d'arriver là où je suis.

BAKHITA

Dédicace

Grace Allah

Je dédie ce modeste travail

*A la mémoire de ma mère **Fatima** que je garde toujours dans mon cœur.*

*A mon chère père **Bakhaira** qui est à l'origine de ce je suis.*

*A ma très chère sœur **Omechikh** qui est toujours sacrifiée pour mon éducation, qui ma entourée de son amour et de son affection, je la remercie et je n'oublierai jamais son soutien moral dans les moments les plus difficile que Dieu la protège.*

*A mes chère sœurs et frères particulièrement **Aek**.*

*A mes enseignants : **Mr Benbeguara, Mr Hadj Said, Mr Hocine** et surtout au **docteur Moulay M.** pour m'avoir donné l'esprit de compétence.*

*A mes adorables **Bakhta, Nadia** qui illuminent mes jours est toute circonstance.*

*A mes amies **Attallah, Mohamed et Mohamed**, pour tous les bons moments que nous avons partagés*

A tous qui m'aide près ou loin.

WIDAD

Remerciements

Avant tout, on remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Nous avons l'honneur et le plaisir d'exprimer nos profondes gratitudee et nos sincères remerciements à *M^{elle} Moulay M.* notre promotrice et notre Co-promoteur *Mr Benbeguara M.* pour leurs précieuses aides, leurs orientations et le temps qu'ils nous ont accordé pour notre encadrement.

Nous tenons à remercier les membres de jury à leur tête Monsieur *Acem K.* qui nous a fait l'honneur de présider ce jury et *M^{lle} Madjber N.* d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Nos remerciements vont également à *Mr Hadj Said A.* et *Mr Hocine L.* qui ont grandement contribué à l'aboutissement de ce mémoire.

Nous remercions aussi tous les techniciens des laboratoires de Microbiologie surtout nos chère *Kheira* et de Technologie alimentaire de la *faculté des sciences de la nature et de la vie* de l'université Ibn Khaldoun-Tiaret.

Table de matières

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des photos.....	III
Liste des abréviations	IV

Introduction	1
--------------------	---

Première partie: Synthèse bibliographique

1. Le lait.....	2
2. Le fromage.....	2
2.1. Le fromage frais.....	2
2.2. Coagulation du lait.....	2
2.2.1. Coagulation acide.....	3
2.2.2. Coagulation enzymatique.....	3
2.2.3. Coagulation mixte.....	3
3. Immobilisation des biomolécules	3
3.1. Intérêt d'immobilisation des biomolécules.....	4
3.1.1. Cellules microbiennes.....	4
3.1.2. Enzymes.....	4

Deuxième partie : Partie Expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

I.1. Objectifs du travail.....	5
I.2. Lieu et date de travail.....	5
I.3. Matériel et Méthodes.....	5
I.3.1. Matériel.....	5
I.3.1.1. matériel biologique.....	5
I.3.1.2. matériel, Appareillages et produits utilisés.....	6

I.3.2.Méthode.....	7
I.3.2.1.Protocole expérimental.....	7
I.3.2.2.Purification de l'argile.....	8
I.3.2.3.Ré-identification des souches bactériennes.....	9
I.3.2.4.Purification des souches.....	10
I.3.2.4.1.Etude morphologique.....	10
a. Examen macroscopique.....	10
b. Examen microscopique.....	10
I.3.2.4.2.Etude biochimique.....	10
a. Test catalase.....	10
b. Type fermentaire.....	11
I.3.2.5.Conservation des souches.....	11
a. Conservation à court terme.....	11
b. Conservation à long terme.....	11
I.3.2.6.Analyse physico-chimique lait.....	12
a. Mesure de pH.....	12
b. Détermination de l'acidité titrable.....	12
I.3.2.7.Activité enzymatique.....	13
a. Mesure du temps de floculation.....	13
b. Détermination de l'activité coagulante.....	13
c. Estimation de la force coagulante.....	14
d. Détermination de temps de prise.....	14
I.3.2.8.Immobilisation des agents coagulants.....	15
a. Protocol expérimental.....	15
I.3.2.9.Fabrication de trois types de fromages frais.....	15
a. Préparation de la pré-culture.....	15
b. Emprésurage.....	16
c. Coagulation.....	16
d. Tranchage.....	16
e. Brassage.....	16
f. Egouttage.....	16
g. Salage.....	17
h. Moulage.....	17

i. Conservation.....	17
I.3.2.10. Etude de la cinétique des souches.....	17
a. Cinétique d'acidification.....	17
b. Cinétique de croissance.....	17
I.3.2.11. Analyse physico-chimique du fromage.....	18
a. Mesure de pH.....	18
b. Détermination de l'acidité titrable.....	18
I.3.2.12. Rendement fromager.....	18
I.3.2.13. Evaluation de qualité du fromage frais.....	19

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Purification de l'argile.....	20
II.2. Ré-identification des souches.....	20
II.2.1. Etude morphologique.....	20
a. Examen macroscopique.....	21
b. Examen microscopique.....	21
II.2.2. Etude biochimique.....	22
a. test de catalase.....	22
b. type fermentaire.....	23
II.3. Analyses physico-chimiques du lait.....	23
a. mesure de pH.....	24
b. détermination de l'acidité titrable.....	24
II.4. Activité enzymatique.....	24
a. Détermination du temps de floculation.....	24
b. Détermination de l'activité coagulante.....	25
c. Estimation de la force coagulante.....	25
d. Détermination du temps de prise.....	25
II.5. Résultats de la cinétique.....	25
a. Cinétique de l'acidité.....	25
b. Cinétique de croissance.....	26
II.6. Analyse physico-chimique des fromages.....	29
a. Mesure de pH.....	29
b. Détermination de l'acidité titrable.....	30

II.7.Rendement fromager.....	30
II.8.Résultats d'évaluation de qualité de fromages.....	31
Conclusion.....	32
Références bibliographiques	
Annexe	
Résumé	

Liste des tableaux

Titre	Page
Tableau 01. Appareillage, verreries, autre	6
Tableau 02. Détermination de la concentration de la suspension en argile	20
Tableau 03. Résultats de la ré-identification des ferments lactiques	20
Tableau 04. Résultats des analyses physico-chimiques du lait	23
Tableau 05. Caractérisation de l'enzyme	24
Tableau 06. Résultats des analyses physicochimiques des fromages frais	29
Tableau 07. Rendement fromager de trois types de fromage	30
Tableau 08. Appréciation sensorielle de trois types de fromage frais fabriqués	31

Liste des figures

Titre	Page
Figure 01. Protocole expérimental.	7
Figure 02. Différentes étapes de purification et de préparation de la suspension en argile.	8
Figure 03. Purification et ré-identification des souches.	9
Figure 04. Préparation du lait.	12
Figure 05. Immobilisation des agents coagulants.	15
Figure 06. Cinétique d'évolution du pH et d'acidité (Ma1; 19D) fixées cultivées sur milieu lait à 30°C.	26
Figure 07. Cinétique d'évaluation du pH et d'acidité (Ma1; 19D) libres cultivées sur milieu lait à 30°C.	26
Figure 08. Cinétique de croissance des souches <i>Lactococcus</i> et <i>Leuconostoc</i> fixées dans le lait à 30°C.	28
Figure 09. Cinétique de croissance des souches <i>Lactococcus</i> et <i>Leuconostoc</i> libres dans le lait à 30°C.	28

Liste des photos

Titre	Page
Photo 01 : Les étapes d'une conservation à court terme.	11
Photo 02 : Aspect de culture pure des lactocoques en milieu MRS liquide, la culture se développe mieux en profondeur où la pression de l'Oxygène est faible.	21
Photo 03 : Aspect des colonies des bactéries lactocoques obtenues après 24 h d'incubation à 30°C sur milieu MRS solide.	21
Photo 04 : Aspect microscopique et arrangement des isolats après coloration de Gram (Gx100).	22
Photo 05 : Test de catalase.	22
Photo 06 : Test de type fermentaire des souches.	23
Photo 07 : Aspect des colonies fixées et libres sur milieu MRS solide (technique de micro-spots).	27
Photo 08 : lait écrémé en poudre	Annexe 01

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

DLC : Date limite de consommation

D.O : Densité optique

ENF : Entreprise Nationale de Fonderie

EPS : exopolysaccharides

FAO: Food and Agriculture organization

H₂O₂: Eau oxygénée

M17: Gélose de Mac Key

MRS : Man; Regosa et Sharpe

Na Cl : Hydroxyde de sodium

Na OH: Hydroxyde de sodium

pH: potentiel d'hydrogéné

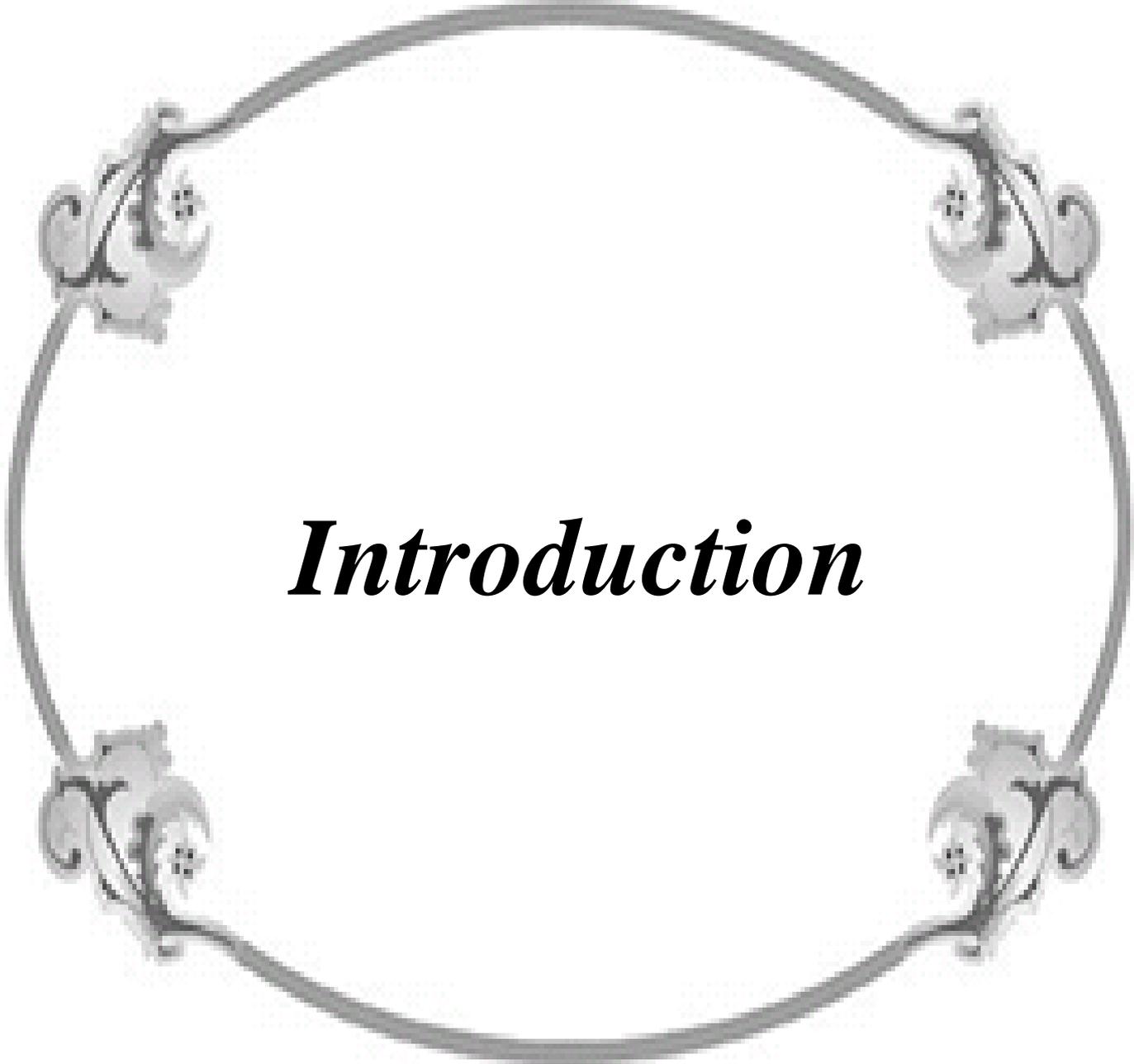
Rf: Rendement fromager

Trs/min: tours/minute

U.A.C: Unité d'activité coagulante

U.F.C: Unité formant colonie

U.P: Unité présure



Introduction

Introduction

Introduction

Le lait est un produit très complexe, représentant en raison de sa forte teneur en eau, de son pH voisin à la neutralité, ainsi sa richesse en composants qui sont aptes à être dégradés par voie microbienne, un milieu fortement altérable (**Henri et al., 2006**).

Afin de remédier à ce problème, l'homme a développé des techniques de transformation aboutissant à une meilleure conservation dont la simple méthode est de le transformer en fromages (**Henri et al., 2006**), tel que le fromage frais ou à pâte fraîche qui est prêt à la consommation peu de temps après sa fabrication (**Loquet et Corrieu, 2005**).

Selon **Mahaut et al. (2000)**; **Luquet et Corrieu (2005)**, L'obtention du fromage frais est résulte le plus souvent d'une coagulation acide à l'aide des ferments lactiques (*Lactococcus diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides*) en combinaison à l'action d'une enzyme.

Mais répondant à un marché qui devient plus exigeant, la recherche des enzymes qui succèdent la présure devient un point primordiale (**Weuster-Bots, 2000**).

Parmi ces enzymes la protéase aspartique produite par *Rhizomucor miehe* dénommée Fromase, qui est le coagulant microbien le plus couramment utilisé pour la production de fromage (**Chitpinyol et Crabbe, 1998**).

Dans ce cadre nous sommes intéressées à l'immobilisation de cette enzyme fongique et les ferments lactiques sur un support solide argileux, le choix de ce dernier a été fait par rapport à ses multiples vertus, notamment comme pansement gastrique, et ceci dont l'objet de contribuer à la réalisation de trois types de fromage frais sous l'action combinée de :

- Ferments lactiques (*Lactococcus diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides*) fixés, enzyme (Fromase[®] 2200TL) fixée;
- Ferments lactiques fixés, enzyme libre;
- Ferments lactiques libres, enzyme libre.

Dans un deuxième temps, comparer certains paramètres (temps de coagulation, caractères organoleptique, rendement.....) entre les différents types de fromage fabriqués.



Première partie :

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

1. Le lait

Le lait est un liquide blanc mat, légèrement visqueux, à une odeur très faible; une saveur douceâtre faiblement sucrée, de sécrétion des glandes mammaires des mammifères comme la vache, la chèvre et la brebis, dont la composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races. Il représente la principale matière première pour la fabrication d'un fromage, dont ce dernier constitue un mode de conservation et de consommation (**Martin et Coulon, 1995 ; vignola, 2002; Béal et Sodini, 2012**).

2. Fromage

Selon la norme **FAO/OMS 1990** modifiée en **2002**; le fromage est un produit frais ou affiné, solide ou semi solide, dont lequel le rapport de lactosérum/caséine n'exécède pas celui du lait. Il assure le passage de ce dernier d'une forme de conservation ancestrale à des produits ayant des propriétés nutritionnelles et organoleptiques appréciées (**Jeanet, 2007**).

Selon le même auteur, la fabrication de fromages passe par quatre phases: standardisation du lait; coagulation ; égouttage et affinage.

Les fromages peuvent être classés en diverses catégories, selon certains critères, tel que l'espèce animale, la teneur en eau et la technologie de fabrication (**Mahaut et al., 2003**).

Selon **Harbott, (2014)**, on peut les classés en fonction de leurs types de croûte et de leur texture, il existe : le fromage frais affiné, pâte molle et croûte fleurie, pâte molle et croûte lavée, pâte pressée, pâte persillée, parfumée, et le fromage frais.

2.1. Fromage frais

Selon la norme de groupe codex pour les fromages non affinés, y compris le fromage frais **CODEX STAN 221-2001**; le fromage frais ou non affiné est un fromage qui peut être consommé juste après sa fabrication.

Il résulte d'une coagulation mixte sous l'action conjointe des ferments lactiques et l'effet coagulant d'une présure (**Mahaut et al., 2000**). Tous les fromages frais ont une DLC de 24 jours (**Leuquet et Corrieu, 2005**).

2.2. Coagulation du lait

En industrie fromagère, la coagulation du lait illustre une étape essentielle, elle correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel des caséines du lait, qui se traduit par une formation d'un gel appelé aussi coagulum ou caillé (**Banon et Hardy, 1991; Farkye, 2004**). Elle peut être réalisée de deux manières: coagulation acide et enzymatique, cependant

Synthèse bibliographique

l'utilisation des deux à la fois (ferments lactiques, enzyme) est la plus dominante en fromagerie (**Farkye, 2004**).

2.2.1. Coagulation acide

L'utilisation des bactéries productrices d'acide lactique par fermentation du lactose, assure une acidification biologique, tout en provoquant un abaissement du pH qui consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique (pH=4.6) (**Mahaut et al., 2005**).

Les ferments lactiques les plus employés dans la fabrication des fromages sont: *Lactococcus diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* (**Luquet et Corrieu, 2005**).

Ils ressemblent des coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, les leuconostocs possèdent un caractère hétérofermentaire marqué avec production d'acide lactique(D), de CO₂ et d'éthanol, leur développement entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides (**Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003; Ogier et al., 2008**). En revanche les lactocoques sont homofermentaires produisant que l'acide lactique L(+), et seul *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diaceteylactis* produit de diacétyle.

2.2.2. Coagulation enzymatique

Elle est réalisée sous l'action d'une enzyme protéolytique où la plus utilisée est la présure (**Mahaut et al., 2000**).

L'accroissement de la production fromagère dans le monde et la punerie de la présure, d'autres enzymes coagulantes d'origine diverse (animale, végétale, ou microbienne) ont été proposées pour la remplacer (**Ernsrom, 1997**).

Parmi ces enzymes la Fromase qui est une protéase acide-aspartate de *Mucor miehie* avec un poids moléculaire de 38000 Daltons. La molécule est constituée d'une chaîne simple de peptides. Elle est stable à 38°C entre des pH de 3,0 à 6,0 avec un optimum de 4,5 (**Jarmul et al., 1982**).

2.2.3. Coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjointe des enzymes coagulantes et des ferments lactiques, conduisant tous les deux à la formation d'un coagulum (**Vetier, 1998**).

3. Immobilisation des biomolécules

D'après **Karel et al.(1985)**, l'immobilisation est le confinement ou la localisation physique d'une biomolécule intacte dans une certaine région de l'espace tout en préservant certaines activités catalytiques souhaitées.

Synthèse bibliographique

3.1. Intérêt d'immobilisation des biomolécules

3.1.1 Cellules microbiennes

L'utilisation de cellules microbiennes immobilisées peut améliorer l'efficacité des fermentations industrielles grâce à des techniques d'immobilisation qui permet de disposer une population microbienne dense, active, et facilement utilisable (**Margaritis et al., 1984 ; Groboillot et al., 1994**).

3.1.2. Enzymes

Les enzymes présentent un fort intérêt dans le domaine de la biocatalyse, cependant leur coût élevé et leur stabilité limitée dans le temps sont des facteurs limitant leur utilisation industrielle, donc une immobilisation permet de les stabiliser au cours de leur utilisation, de pouvoir les réutiliser et de séparer l'enzyme des produits de la réaction enzymatique (**Stéphanie, 2012**).

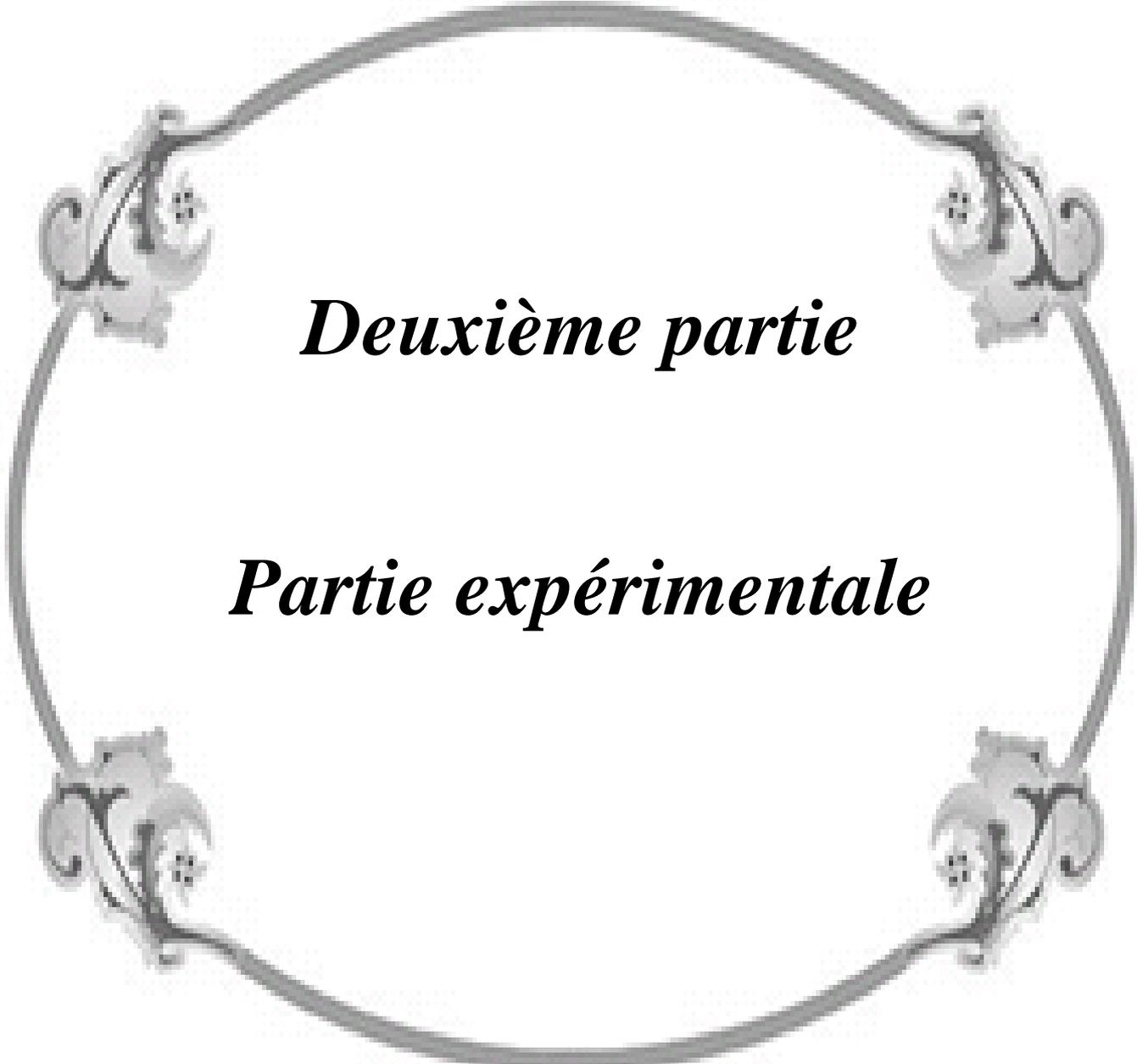
3.2. Les méthodes d'immobilisation

Il existe de nombreuses techniques d'immobilisation qui ont été développées, parmi ces techniques l'immobilisation par adsorption qui repose sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface (**Kourkoutas et al., 2004**). Cependant elle demeure un phénomène réversible en fonction de l'âge des cellules, de la composition de la membrane cellulaire, du pH et de la composition ionique du milieu.

Selon **Strehaiano et al. (2006)**, les supports utilisés peuvent être des matériaux de nature très diverse : bois, silice, bentonite. Tandis que l'utilisation des bentonites semble être une méthode efficace, pratique, peu coûteuse et sans risque pour l'environnement.

4. Argile de Maghnia

La Bentonite désigne généralement une poudre minérale constituée essentiellement de montmorillonite (80%) ce qui explique sa capacité de rétention d'eau. Elle provient d'un gisement de Hamam Bouhrara (Maghnia). C'est une Bentonite sodique, caractérisée par une capacité élevée d'adsorption, d'échange ionique et de gonflement (**Belkacemi, 1993**).



Deuxième partie

Partie expérimentale



Chapitre I : Matériel et Méthodes

I.1. Objectif de travail

Notre présent travail consiste à fabriquer trois types de fromage frais par coagulation mixte (lactique et enzymatique),

- **Fromage type I** est préparé par l'utilisation des bactéries lactiques (*Lactococcus diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides*) libres, enzyme (*Fromase*[®]2200TL) libre;
- **Fromage type II** est obtenu par l'utilisation des bactéries lactiques immobilisées, enzyme libre;
- **Fromage type III**, les deux agents coagulants sont fixés.

D'autre part, il s'agit de déterminer le rendement fromager pour les trois types, ainsi de voir l'effet de l'immobilisation des agents coagulants sur la qualité organoleptique des fromages préparés.

I.2. Lieu et période de travail

Notre travail est réalisé dans les Laboratoires de Microbiologie, Technologie alimentaire et de Biochimie de la *Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*-UNIVERSITE IBN KHALDOUN TIARET, durant une période allant du 30/01/2018 au 25/04/2018.

I.3. Matériel et méthodes

I.3.1. Matériel

I.3.1.1 Matériel biologique

- Souches utilisées

Les deux souches utilisées dans notre expérimentation pour la fabrication du fromages sont: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, proviennent de la collection du laboratoire de Microbiologie Appliquée et fondamentale (LMA) de l'université Ahmed Benbella Oran I, isolées à partir du lait cru de chèvre.

- **Enzyme**

L'enzyme utilisée dans la coagulation du lait dénommée *Fromase*[®]2200 TL en poudre commercialisée par la firme Française Rapidase, provient de laboratoire de Microbiologie Appliquée de la *Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*-UNIVERSITE IBN KHALDOUN TIARET).

- **Lait**

Deux types du lait sont utilisés :

Lait entier en poudre de la marque (Célia) à 25% de matière grasse provenant du marché locale (Annexe 09) ;

Lait écrémé en poudre à 0% de matière grasse provient du GIPLAIT Tiaret (Annexe 01).

- **Argile**

L'argile utilisée dans notre travail ; provient d'un gisement près de Hammam Boughrara (Maghnia), et nous a été offerte par l'ENF.

3.1.2.1.1. Matériel, appareillages et produits utilisés

Le matériel utilisé dans notre expérimentation est présenté dans le tableau 01.

Tableau 01 : Appareillages, verreries, produits chimiques et autres

Appareillage	Verreries	Produits chimiques et milieux de culture	Autres
<ul style="list-style-type: none"> - Étuve (Memmert) - Bain marie (Memmert) -Agitateur magnétique thermique (Stuart) - Balance électrique (sartorius) -pH-mètre (Hanna) - Spectrophotomètre (Pharmacia Biotech) - Réfrigérateur (IRIS) -Autoclave (Wolf) -vortex (TechnoKartell) -centrifugeuse(SIGMA203) -microscope optique -pompe à vide 	<ul style="list-style-type: none"> - Béchers - Burettes - Entonnoirs - Erlenmeyers - Eprovettes graduées - Flacons - Lames - Pipettes graduées (2,5 et 10ml) - Pipettes Pasteur - Tubes à essai -portoir - Thermomètre 	<ul style="list-style-type: none"> - Agar - Eau distillée - Eau oxygénée (H₂O₂)99.8% - Éthanol 96% - Extrait de levure - Fuschine de Ziehl - Lugol - Phénolphtaléine, - Sel de table - NaOH (N/9) - Violet de gentiane - Milieu M17 (liquide et solide) -Milieu MRS (liquide et solide) -lait écrémé -glycérol 	<ul style="list-style-type: none"> - Anses de platine - Seringues - Spatules -Bec bunsen -Boites de Pétri -Barreaux magnétique -Cloches du Durham -Pincés à bois -pissettes -papier aluminium -Papier hygiénique - Micropipette 10µl -tamis 106µm -dessiccateur -papier filtre

I.3.2. Méthodes

I.3.2.1. Protocole expérimental

La figure 01 résume les étapes de notre protocole expérimental.

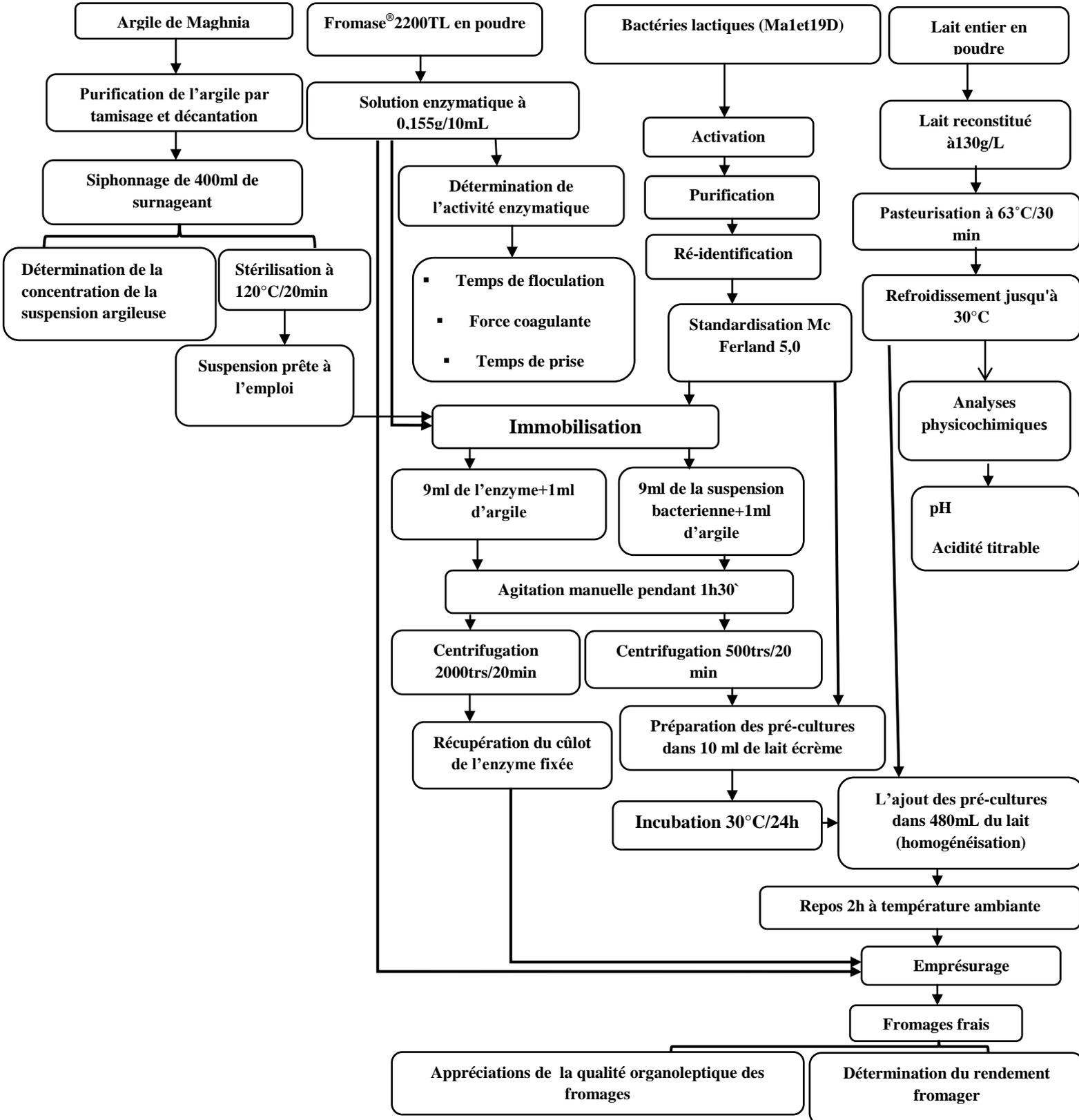


Figure 01 : protocole expérimental.

I.3.2.2. Purification d'argile et détermination de la concentration

D'après **Moulay et al.(2016)**, les principales étapes de purification de l'argile sont les suivantes.

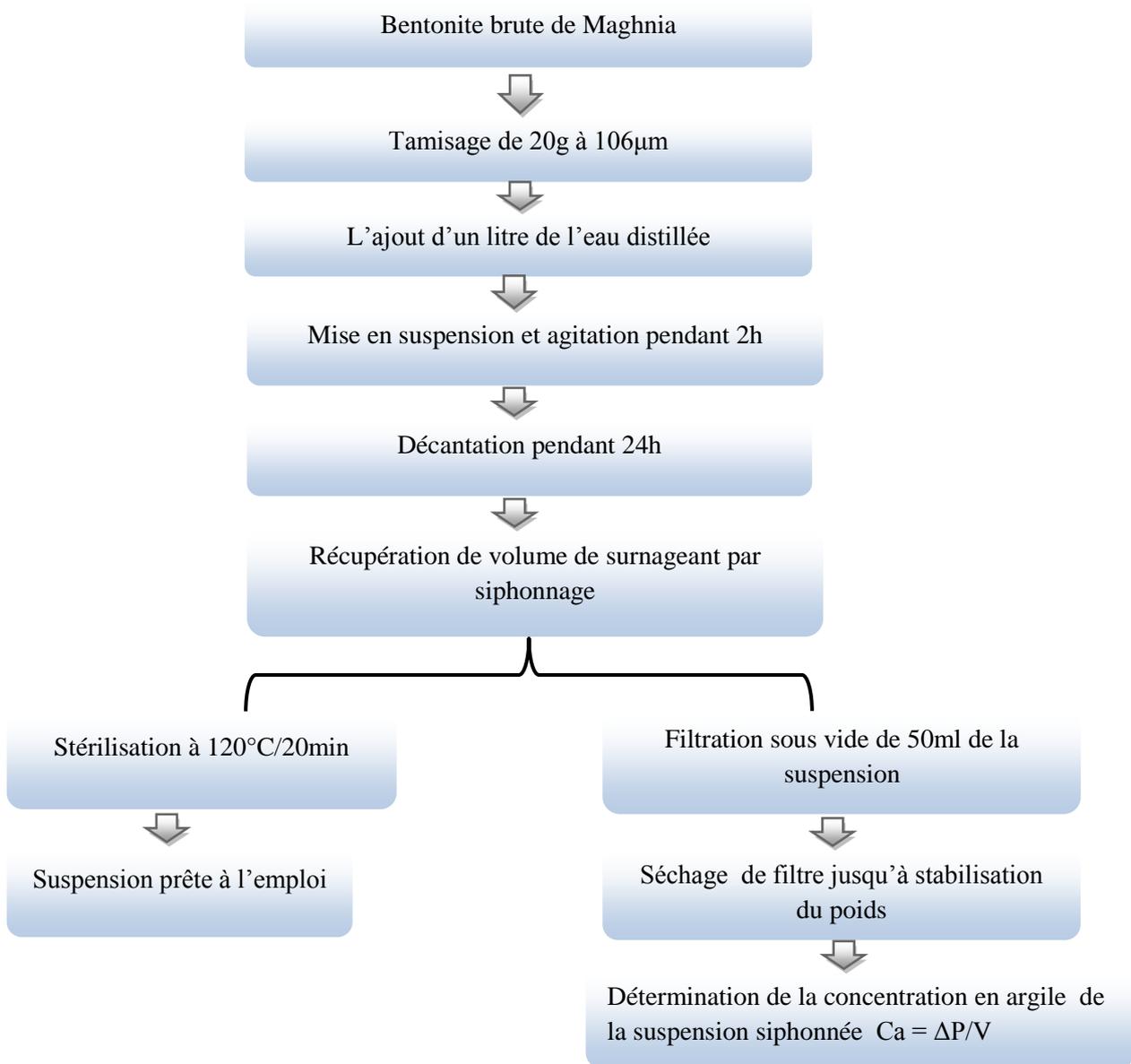


Figure 02 : purification et détermination de la concentration

Dans l'objet d'obtenir une suspension argileuse purifiée, 20g d'argile ont été tamisés dans un premier temps à l'aide d'un tamis (106µm), puis versés dans un litre d'eau distillée et agités pendant 2h puis laissés décanter pendant 24h. Après décantation 400ml de la partie supérieure de la suspension a été récupéré par siphonnage. Seulement 50ml de la suspension siphonnée a été filtré sous vide pour déterminer la concentration d'argile.

Les 350ml de la suspension siphonnée qui reste ont été stérilisés à une température de 120°C/20min pour les utiliser dans la fixation des agents coagulants ultérieurement.

$$Ca = \Delta P / V$$

Où :

Ca : concentration en argile en g/l

ΔP : différence du poids du papier filtre séché après filtration et le poids de papier filtre séché avant filtration en g

V : volume de suspension filtrée en ml

I.3.2.3. Repiquage et revivification des souches

Les étapes de la purification et la ré-identification des isolats étudiés sont résumés dans la figure 03.

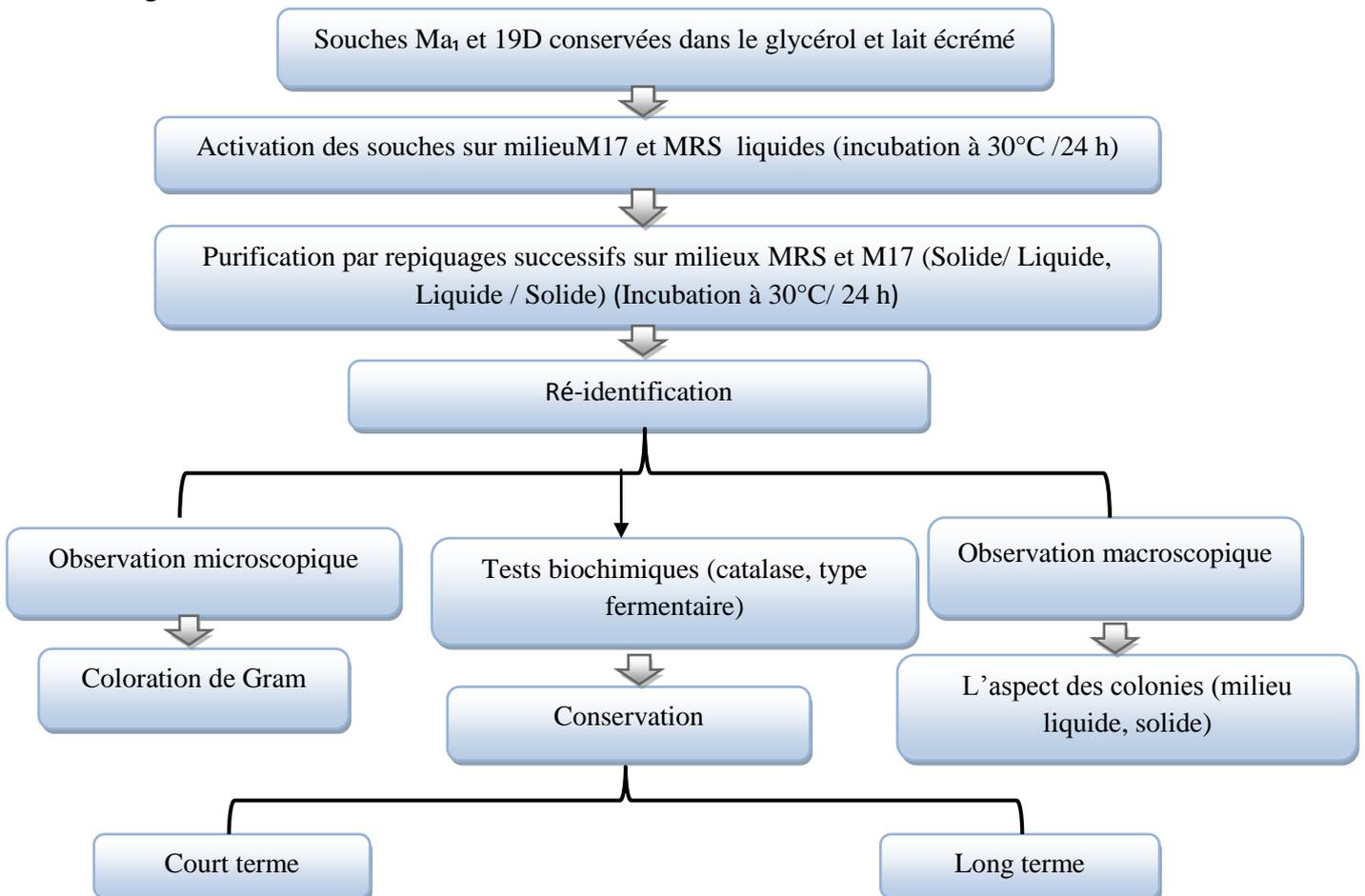


Figure 03 : purification et ré-identification des souches.

Les souches utilisées sont sous forme congelée en cultures pures additionnées au lait écrémé et glycérol. Selon **Guiraud, (1998)**, sont activées par repiquage de la façon suivante :

- Prendre une goutte d'inoculum dans 5ml de milieu de croissance, M17 pour les lactocoques et MRS pour les leuconostocs ;
- Incubation à 30°C pendant 24 h.

L'apparition de trouble indique la croissance des souches (**Hariri et al., 2009**).

I.3.2.4. Purification

La purification des bactéries lactiques consiste à établir successivement des repiquages sur les milieux (MRS et M17) liquide et solide jusqu'à l'obtention des colonies ayant du même taille, forme et couleur qui reflètent sur la pureté des souches (**Badis et al., 2005**).

I.3.2.4.1. Caractérisation morphologique

a. Aspect macroscopique

Selon **Badis et al. (2005)**, l'examen macroscopique est basé sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS solide et liquide, pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu MRS solide, et le trouble en milieu liquide.

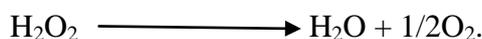
b. Aspect microscopique

L'aspect microscopique a été déterminé par l'intermédiaire de la coloration de Gram (Annexe 02) qui permet de différencier les bactéries à Gram négatif de celle à Gram positif ainsi d'examiner la forme et le mode d'association des cellules (**Singleton, 1999 ; Hassaine, 2013**).

I.3.2.4.2 Caractérisation biochimique

a. Test de catalase

D'après **Marchal et al. (1991)**, la catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O et $1/2O_2$.



La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif.

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée dans laquelle sera dissocié un petit prélèvement de la colonie. La souche examinée est dite catalase positive si un dégagement gazeux est observé et le contraire indique l'absence de l'enzyme (**Marchal et al., 1991**).

b. Type fermentaire

Le test permet d'identifier le type du métabolisme du substrat carboné, des bactéries homofermentaire de celle hétérofermentaire (**Hassaine, 2013**).

Ce test consiste à faire un ensemencement des souches préalablement préparées dans des tubes contenant du bouillon MRS, avec une cloche de Durham, suivi par une incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures (**Hariri et al., 2009**).

Les bactéries hétérofermentaires vont produire l'acide lactiques et le CO₂ à proportion égale ce qui manifeste par l'apparition du gaz dans la cloche de Durham qui est absent dans le cas des bactéries homofermentaires qui vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO₂ (**Bourgeoise et al., 1996 ; Carr et al., 2002**).

I.3.2.5. Conservation des souches

a. Court terme

La conservation des souches pure à court terme est effectuée sur milieu solide MRS incliné. Après croissance à température optimale (30°C), les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les quatre semaines (**Badis et al., 2005**).

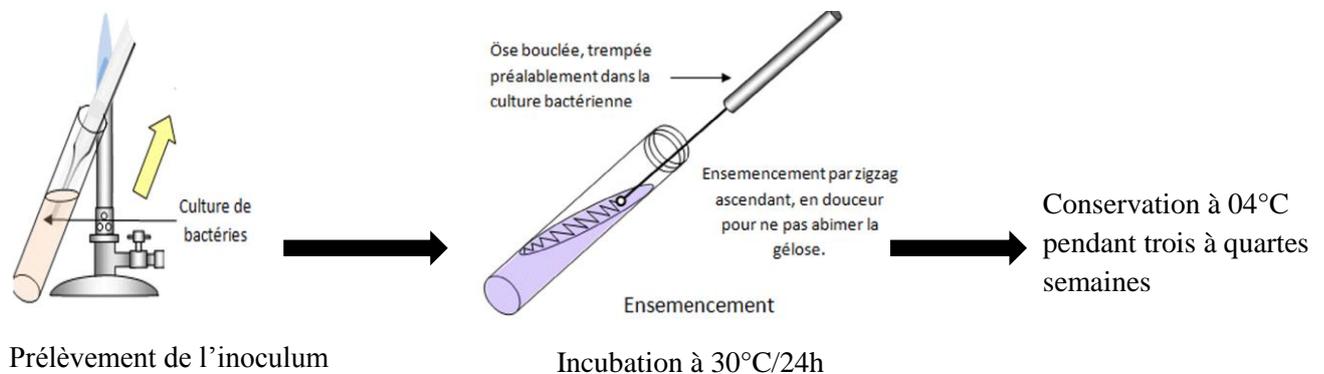


Photo 01 : les étapes d'une conservation à court terme.

b. Long terme

A partir des cultures de 24 h les cellules sont récupérées par centrifugation 3000trs/5min, une fois le surnageant est éliminé; on ajoute le milieu de conservation sur le cûlot, qui contient 70% de lait écrémé et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension en tubes éppendorfs à (-18°C) pendant plusieurs mois (**Badis et al., 2005**).

I.3.2.6. Préparation et analyses physico-chimiques du lait

a. Préparation du lait

Les étapes de la préparation du lait sont résumées dans la figure 04.

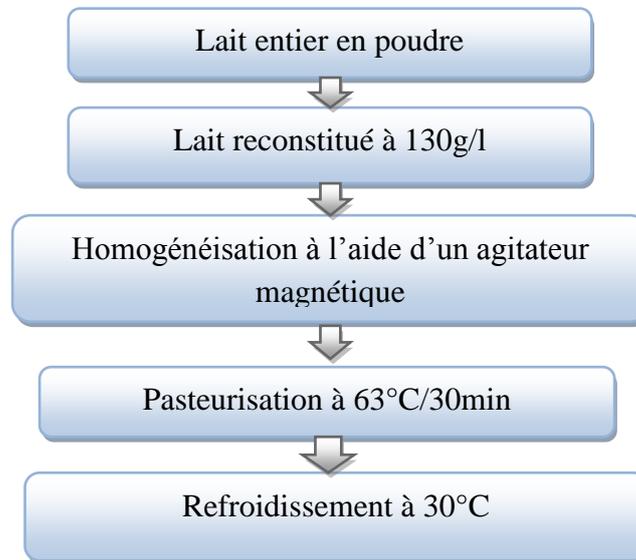


Figure 04 : préparation du lait

b. Analyses physico-chimiques du lait

- **pH**

- **Principe**

Le pH est un paramètre représentant l'acidité du lait à un moment donné, il est déterminé à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné dont la valeur est lue directement sur l'écran de l'appareil (AFNOR, 1986).

- **Mode opératoire**

Le mode opératoire pour la détermination du pH est donné par Sina, (1992) qui consiste à:

- étalonner l'appareil à l'aide de deux solutions tampons (pH 7 et 4) à 25°C ;
- rincer l'électrode à l'eau distillée puis sécher avec du papier buvard ;
- plonger l'électrode pour lire le pH de solution.

- **Acidité titrable**

- **Principe**

L'acidité titrable permet de vérifier la qualité du lait au stade de réception (Alais, 1975), elle indique les réactions d'acidification bactériennes. Elle est déterminée à l'aide d'une solution de soude à N/ 9 (0,111mol/l) et le phénolphtaléine comme indicateur coloré du point de neutralisation par changement de couleur rose pale (Mathieu ,1998).

- **Mode opératoire**

Un volume de 10ml de lait est prélevé à l'aide d'une pipette et versé dans un bécher, puis on ajoute une goutte de phénolphtaléine à 1% , ensuite on titre l'acidité en ajoutant la solution de la soude à 0,1N goutte à goutte à l'aide d'une burette de Mohr jusqu'à l'obtention d'une coloration rose persistante.

Les résultats sont exprimés en degré Doronic ou en pourcentage de l'acide lactique, un degré Doronic (°D) correspondant à 0,1 g d'acide lactique par litre du lait.

$$\text{L'acidité} = V \times 10$$

Où V est le volume en ml de solution de soude versé pour titrer l'acidité de 10ml de la solution mère (Salgui et al., 2005).

I.3.2.7. Activité enzymatique

a. Temps de floculation

Le temps de floculation est le temps qui s'écoule entre l'ajout de la présure dans le lait et l'apparition des premiers flocons.

Selon Houins et al. (1973), la mesure de temps de floculation est effectuée sur 10ml de substrat emprésuré placé dans un tube à essai soumis à une rotation de 6 à 8 t/min et maintenu dans un bain-marie à la température de 35°C. Le chronomètre est arrêté dès l'apparition des premiers flocons sur la paroi du tube.

b. Activité coagulante

Le pouvoir coagulant des protéases est déterminé par mesure de l'activité coagulante, exprimé en U.A.C ou U.P qui est défini comme étant la quantité d'enzyme par millilitre d'extrait enzymatique qui peut coaguler 10ml de lait en 100 sec à 35°C (Berridge, 1955 ; Alais, 1972; Ramet, 1997).

L'activité coagulante est donnée par la formule suivante :

$$\text{U.A.C/ml} = 10 \times V / T \times V'$$

Où :

V: volume de lait en ml

T: temps de floculation en seconde

V': volume de la solution enzymatique en ml

➤ **Mode opératoire**

- Un volume de 10ml de lait est versé dans un tube à essai et porté à 35°C dans un bain marie.
- Le chronomètre est déclenché au temps zéro dès l'ajout de 10µl de la solution enzymatique (Fromase® 2200TL).
- Le tube immergé est maintenu incliné de telle sorte que le niveau de lait soit au- dessous du celui de l'eau.
- Le temps de floculation est déterminé lors l'observation du film mince sur la partie supérieur du tube.

c. Force coagulante

L'activité coagulante est également exprimée par la force qui est déterminée par mesure du temps de floculation sur le même substrat à 35°C. La force coagulante est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Force} = 2400 \times V / T \times V'$$

Où :

V: volume du lait en ml.

V': volume de l'extrait enzymatique.

T: temps de floculation en sec.

d. Temps de prise

Le temps de prise correspond à l'apparition de premières gouttelettes du lactosérum sur la surface du gel qui devient rigide (Alais, 1974).

I.3.2.8. Immobilisation des agents coagulants

D'après les expériences qu'ont été réalisées par **Moulay et al. (2016)**, les étapes de l'immobilisation sont résumées dans la figure 05.

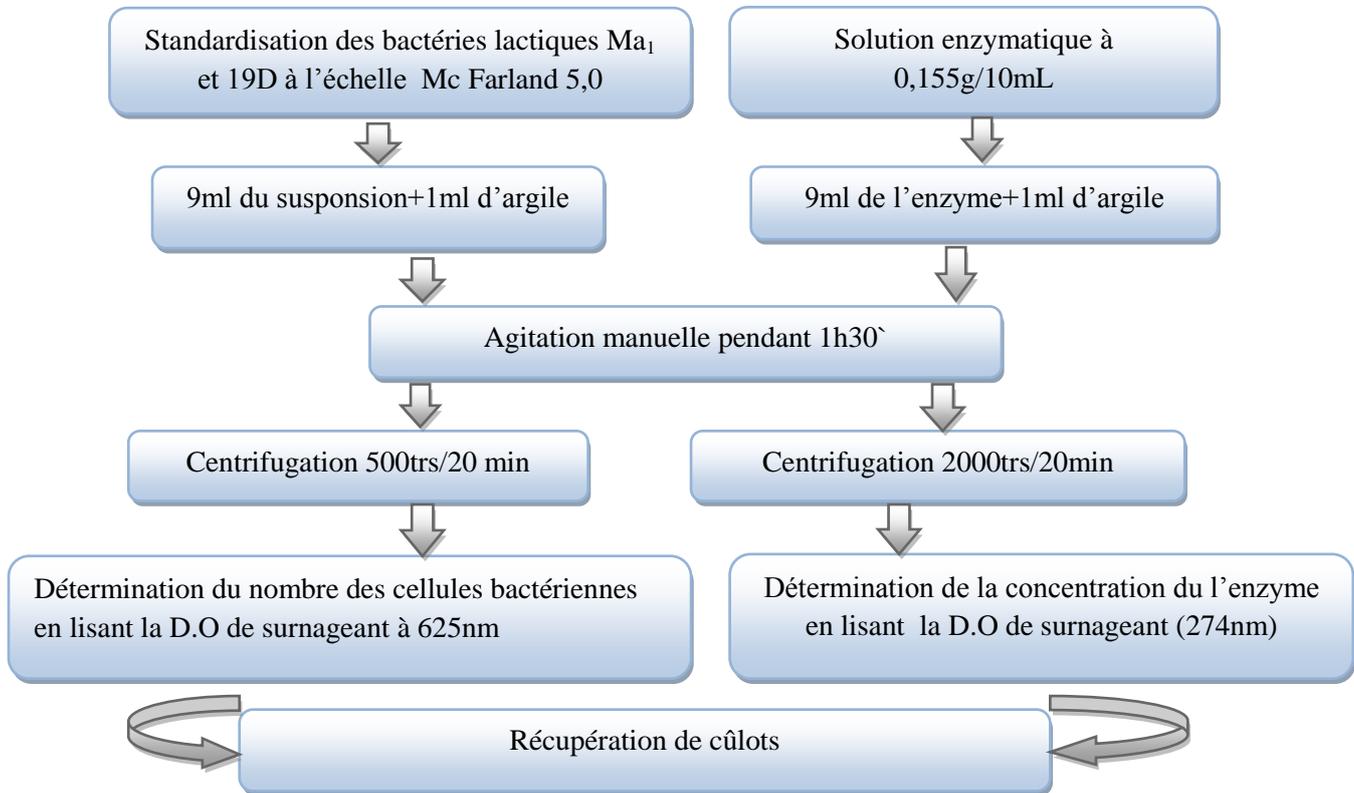


Figure 05 : immobilisation des agents coagulants.

I.3.2.9. Fabrication de fromage frais

Les étapes de la fabrication de trois types de fromage frais sont les suivantes :

a. Préparation des pré-cultures

❖ Bactéries lactiques libres

D'après **kihal et al. (2009)**, dans deux tubes contenant 10ml du lait écrémé stérile, on inocule les deux souches standardisées séparément (Annexe 03).

Dans le premier on inocule *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *.diacetylactis*.

Dans le deuxième on inocule *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Puis les deux tubes sont incubés à une température de 30°C/24h.

❖ Bactéries lactiques fixées

Après fixation de 9ml de chaque souche bactérienne standardisée, avec 1ml d'argile, on procède à une centrifugation 500 tr /20min, puis on récupère les cûlots.

Ajouter 9ml du lait écrémé à chaque cûlots récupéré et en fin on incube à 30°C pendant 24h.

b. Ensemencement des pré-cultures

L'ensemencement des prés cultures préparées (fixées et libres) se fait comme suit :

Après la pasteurisation du lait à 63°C et refroidissement jusqu'à 30°C ; on inocule séparément les prés cultures dans trois cristallisoirs stériles, les deux premiers avec une culture mixte des bactéries fixées, le troisième est inoculé par des bactéries libres dont chaque un contient 480 ml du lait entier reconstitué.

c. Emprésurage

Après une durée de maturation de deux heures à une température de 30°C ; cette étape est réalisée par l'ajout de 0.48ml du Fromase[®]2200TL libre préparée préalablement à une concentration de 0.155g/10ml à un volume de :

500ml du laitensemencé avec des ferments libres, (pour le fromage type I), et à 500ml du laitensemencé par des ferments fixés (fromage type II) et pour le troisième type, on ajoute le cûlot d'une Fromase[®]2200TL fixée à un volume de 500ml du lait mûré avec des ferments fixés.

d. Coagulation

Après l'emprésurage le lait est laissé au repos à une température ambiante pendant 24 heure .il va prendre en masse (caillage) avec une consistance plus ou moins ferme selon le degré d'acidité développée.

e. Tranchage

Dans cette étape un tranchage vertical du caillé formé est nécessaire pour faciliter l'écoulement du lactosérum.

f. Brassage

Se fait par mixtion à l'aide d'un fouet dont le but de diminuer la taille des graines du caillé.

g. Egouttage

Il s'agit d'une phase essentielle qui conditionne directement la composition du fromage (**Ramet, 1985**) qui se traduit par une séparation manuelle du caillé du lactosérum par filtration à l'aide d'un tissu (chèche) et laissé égoutter, pendant 24h.

h. Salage

Le salage constitue une phase importante dans la fabrication du fromage, il a été effectué dans une saumure (500ml d'eau distillé+10g de sel de cuisine) pendant 20min, suivi par un deuxième égouttage.

i. Moulage

Selon **Eck et Gillis, (1997); Vignola, (2002)**, le moulage consiste en mise en forme dans des moules dont découlera extérieur et la forme du fromage.

j. Conservation

On conserve le fromage frais à une température de 4°C pendant 24h.

3.2.4. Etude de la cinétique d'acidification et de croissance

Après l'inoculation de la pré-culture dans le lait qui servira à la fabrication du fromage. A un intervalle de temps régulier, les échantillons ont été prélevés de façon aseptique pour suivre le pH, l'acidité Dornic, et l'évolution de nombre des cellules (**Zarour et al., 2012; Moulay et al., 2013; Guetouache et Guessas, 2015**).

a. Cinétique d'acidification

Selon la méthode décrite par (**Accolas et al., 1977; Kihal et al., 1996; Rhiat et al., 2011**), l'évaluation de l'acidité produite par les souches (*Lactococcus* et *Leuconostoc*) dans le lait est réalisée à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné, et par titrimétrie en titrant 10ml de lait avec une solution basique NaOH N/9, et en utilisant comme un indicateur coloré le phénolphtaléine (**Zarour et al., 2012**).

b. Cinétique de croissance

Le suivi de la cinétique de croissance a été réalisé par la technique des micro-spots décrit par **Bulard, 2012**. C'est une technique de dénombrement facile, et moins consommatrice de matériel microbiologique par rapport à la méthode classique.

➤ Mode opératoire

- Des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-7} ont été préparées pour chaque tube à essai.
- Un volume de 10µl de chaque dilution (spot) est déposé sur une surface de gélose MRS déjà gélifié.
- Chaque spot est reproduit 4 à 6 fois.
- Après séchage des micro-spots, les boîtes de pétri sont ensuite retournées et incubées à 30°C /24h.

En tenant compte, seulement les spots contenant de 3 à 60 colonies

➤ Expression des résultats

D'après **Joffin et Leyral, (2006)**, les résultats ont été exprimés selon la relation suivante :

$$N = \sum C / (n1 + 0.1n2)d$$

N: nombre d'unité formant colonie (UFC)/ml.

ΣC: la somme des colonies comptées sur les spots.

n1: le nombre de spots comptés à la dilution la plus faible.

n2: le nombre de spots comptés à la dilution la plus élevée.

d: la valeur correspondant à la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements ont été retenus.

I.3.2.11. Analyse physico-chimique de fromage

a. Mesure de pH

Prélever 10g de chaque échantillon de fromages frais et les homogénéisés avec un volume de 90ml de l'eau distillée stérile. Le pH des échantillons a été déterminé en utilisant un pH-mètre ou l'électrode a été inséré directement dans l'échantillon (**Owusu-Kwarteng, 2012**).

b. Mesure de l'acidité titrable

On prend 10g de chaque type de fromage frais fabriqué et les ajoutés séparément à 90ml d'eau distillée. Les mélanges ont été bien homogénéisés, 10ml de chaque suspension est titré par une solution de soude N/9, en présence de phénolphtaléine. Ce dernier indique le point de neutralisation par changement de couleur (rose pâle).

I.1.2.12. Rendement fromager

Le rendement fromager correspondant à la quantité de fromage que l'on peut être obtenir avec une quantité fixée du lait (**Bank et al., 1986**).

La détermination du rendement fromager est donnée par la formule citée par (**Kouniba et al., 2007**).

$$Rf = C/L \times 100$$

Avec :

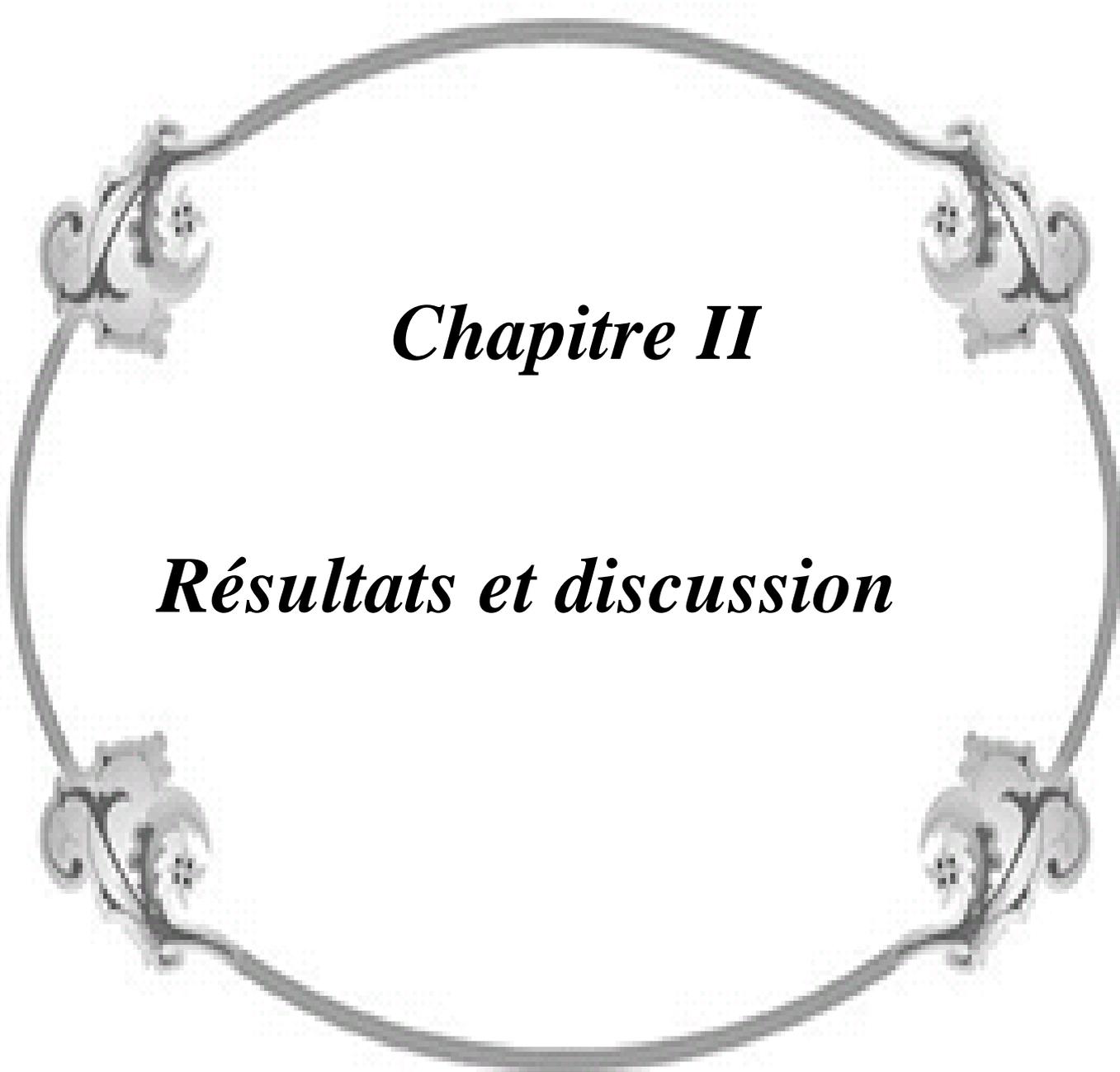
L: poids du lait (g)

C: poids du caillé (g)

I.3.2.13. Evaluation de la qualité sensorielle

Selon **Chambers et al. (2005)**, l'analyse sensorielle consiste à apprécier les propriétés organoleptiques des produits par les organes de sens. La caractérisation de ces propriétés pour les fromages comportent : l'apparence, la texture, et l'ensemble des sensations olfacto-gustatives (odeurs, saveurs, arômes...etc).

Les évaluations sensorielles des trois types de fromages frais fabriqués sont réalisées dans une salle au laboratoire d'analyse microbiologique de *la faculté des sciences de la nature et de la vie*-Université de Ibn-Khaldoun Tiaret, par un jury de dégustateurs comporte 13 personnes qui évaluent la qualité organoleptique des 03 types de fromage selon cinq paramètres différents (la couleur ; l'aspect ; la texture ; le gout ; l'odeur) et donneront un avis final (Annexe 10).

A decorative oval frame with a thick grey border. At each of the four corners, there is a stylized floral or vine motif in a light grey color, featuring leaves and small flowers. The text is centered within this frame.

Chapitre II

Résultats et discussion

II.1. Détermination de la concentration de la suspension en argile

La détermination de la concentration de la suspension en argile nécessite une stabilisation du poids du papier filtre utilisé avant et après filtration. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2 : Détermination de la concentration de la suspension en argile

Nombre des pesées	Poids de papier filtre séché (g)		Différence du poids stable $\Delta P(g)$	Concentration d'argile Ca (g/l)
	Avent filtration	Après filtration		
Pesée 01	1.0092	1.5090		
Pesée 02	0.9953	1.5081		
Pesée 03	0.9891	1.5081		
Pesée 04	0.9891	1.5080		
Poids stable	0.9891	1.5081	0.5199	10.38

La valeur trouvée de la concentration de la suspension en argile est de 10.38g/L, cette valeur est inférieure à celle trouvée par **Bouakka et al. 2015** qui est de 17g/l.

II.2. Ré-identification des souches lactiques

Les résultats des examens morphologique et biochimique des isolats utilisés sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : résultats de la ré-identification des bactéries lactiques.

Caractère Souches	Morphologique			Test biochimique	
	Aspect macroscopique	Aspect microscopique		Test de catalase	Type fermentaire
		Gram	arrangement		
(Ma1)	Colonies de petites taille ; rondes ou lenticulaire, de couleur blanchâtre et bien arrondie avec un contour régulier	positive	Coque, associée en paire, ou en courtes chainette	négative	homofermentaire
(19D)					hétérofermentaire

II.2.1. Etude morphologique

a. Test macroscopique

L'observation macroscopique des isolats nous a permis de confirmer que :

Sur milieu solide les colonies obtenues apparaissent sous forme ronde ou lenticulaire ; de petites tailles avec un contour régulier de couleur blanchâtre (photo 03).

On observe sur le milieu liquide la présence d'un trouble fumeux homogène, concentré au fond du tube et surmonté d'une zone claire. Cela signifie que la culture se développe mieux en profondeur où la pression de l'oxygène est faible ce qui reflète la recherche des conditions micro-aérophile des bactéries (photo 02).

Nos résultats sont compatibles à ceux trouvés par **Kihal, 1996; Hariri, 2000; Ismaili et al., 2016.**

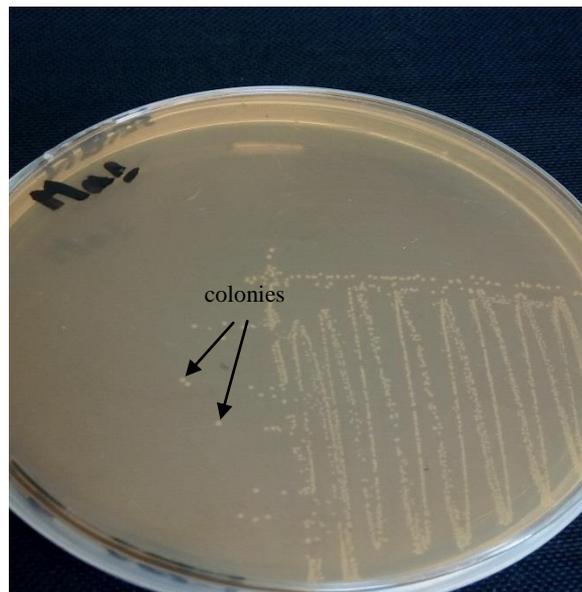
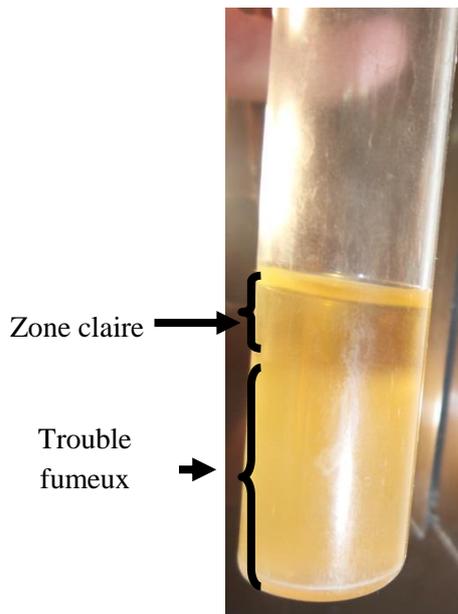


Photo 02 : Aspect de cultures pures des lactocoques, en milieu MRS liquide, la culture se développe mieux en profondeur où la pression de l'oxygène est faible.

Photo 03 : Aspect des colonies des lactocoques obtenues après 24h d'incubation à 30°C sur milieu MRS solide.

b. Test microscopique

L'observation microscopique a relevé que les colonies purifiées sont à Gram positif, se présentent en forme de coques disposées en paires et en courte chainettes (photo 04).

Les résultats obtenus concordent à ceux trouvés par **Badis et al., 2005; Kihal et al., 2009; Moulay et al., 2013.**

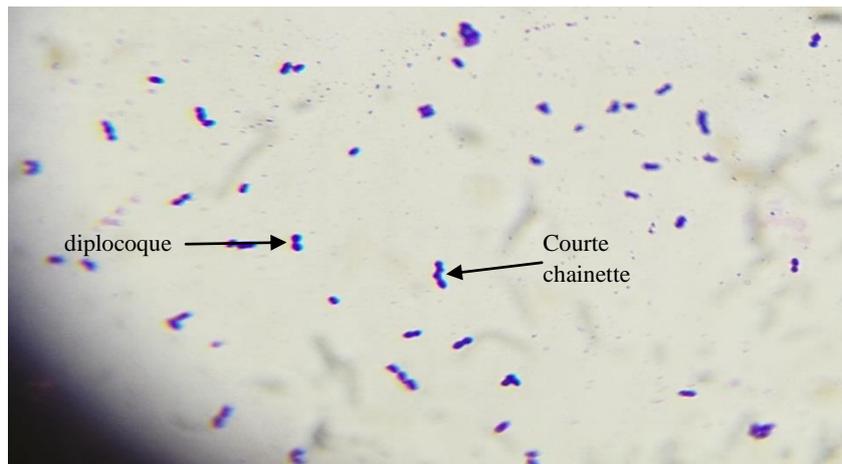


Photo 04 : aspect microscopique et arrangement des isolats après coloration de Gram(Gx100).

II.2.2. Etude biochimique

a. Test de la catalase

D'après les résultats trouvés, nous observons l'absence de dégagement des bulles d'air après l'ajout des gouttes de H_2O_2 sur la colonie cible, ce qui révèle que nos souches ont une catalase négative (photo 05).

Ces résultats sont semblables à ceux trouvés par Carr *et al.*, 2002; Guessas et Kihal, 2004; Ismaili *et al.*, 2006.



Mise en contact des colonies avec quelques gouttes de H_2O_2

Photo 05 : Test de catalase

c. Type fermentaire

Les résultats obtenus sont illustrés dans la photo(06), ce test nous a permis de distinguer entre les souches hétérofermentaires et homofermentaires.

La souche *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* fermente le glucose avec production d'acide lactique, éthanol et le CO₂ qui apparaît dans la cloche de Durham, et qui se manifeste par son flottement (photo 6A).

Par contre ; la souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* est incapable de le produire (photo 6 B) donc elle est considérée comme homofermentaire.

les travaux réalisés par **Bourel et al., 2001; Tember et Greis, 2006** confirment nos résultats.

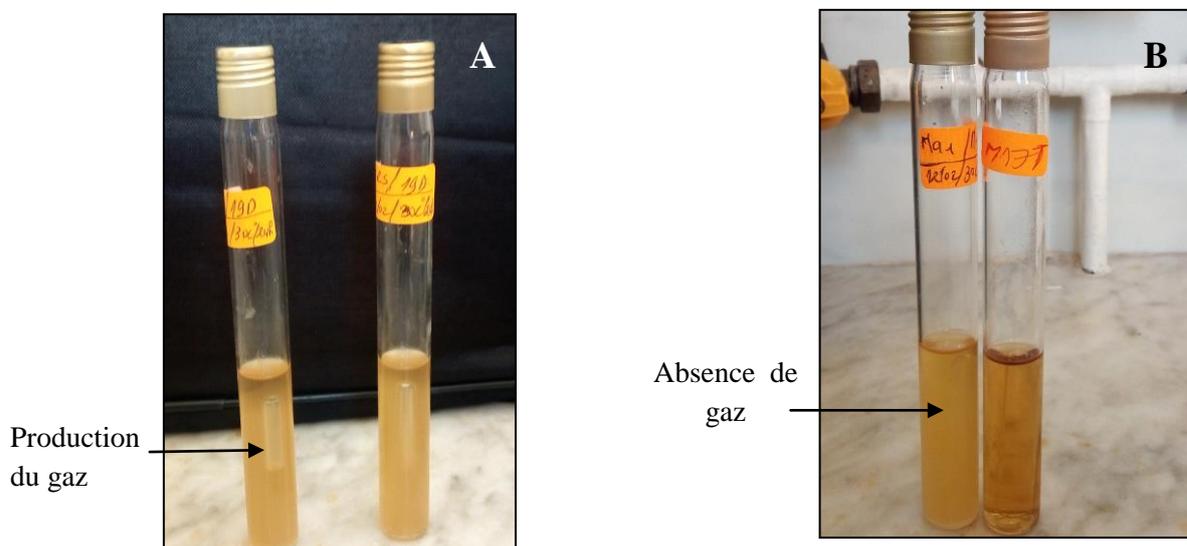


Photo 06 : Test de type fermentaire. *Leuconostoc*19D (A) et *Lactococcus diacétylactis* Ma₁(B).

II.3. Analyses physicochimiques du lait

Les résultats des analyses physico-chimiques du lait entier utilisé dans notre travail sont donnés par le tableau suivant :

Tableau 04 : résultats des analyses physicochimiques du lait.

Paramètres	valeur
Acidité (°D)	20
pH	6.7

a. pH

La valeur du pH du lait trouvée est égale à 6.7, on constate que cette valeur est située dans l'intervalle des résultats trouvés par **Vignola, 2002 ; Brauger et al., 2007; Vierliny, 2008**, soit (6.6-6.8).

b. Acidité titrable

D'après le résultat présenté dans le tableau 04, la valeur de l'acidité titrable du lait est de l'ordre de 20°D. Cette valeur est conforme à celle trouvée par **Esseghir, 2008** dont l'acidité du lait est comprise entre 19-23°D.

En revanche et comparativement aux valeurs données par **Larpen (1997)**, qui varient entre 14 à 17°D, ce résultat est supérieur.

D'après **Mathieu, (1998)**, le pH et l'acidité dépendent de la teneur en caséine, en sels minéraux et ions, ainsi que les conditions hygiéniques lors de la traite, de la flore microbienne totale et son activité métabolique.

II.6. Caractérisation de l'enzyme

Les résultats de la caractérisation de l'enzyme Fromase[®]2200TL sont regroupés dans le tableau 05.

Tableau 05 : caractérisation de l'enzyme.

Paramètres	valeur
Temps de floculation (sec) à 35°C	337
Temps de coagulation (min)	30.38
Activité coagulante (unité/ml)	29.67
Force de coagulation	1/7121.66

a. Temps de floculation

La mesure de temps de floculation a été réalisée visuellement dans des conditions de température standardisée à 35°C.

L'apparition des premiers flocons visibles à l'œil nu sur la paroi du tube est enregistrée après 337sec à partir de l'ajout de la Fromase[®]2200TL, ce résultat concorde avec celui rapporté par **Alais, 1974** soit 180 à 600sec.

b. Activité coagulante

D'après nos résultats citées dans le tableau 05; on constate que 10 μ L de la Fromase[®]2200TL coagule 10ml du substrat du lait ; ce qui traduit par une activité coagulante de 29.67U/ml cette activité est proportionnelle au temps de floculation.

La valeur trouvée de l'activité coagulante est inférieure à celle de la présure qui est égale à 45 U/ml, trouvée par **Alais, 1984**.

c. Force coagulante

Selon les résultats obtenus dans le tableau 05 la force coagulante de la Fromase[®]2200TL est de 1/7122 ; cette valeur est proche à celle de la présure (1/10000) **Jarmule et al., 1982**.

d. Temps de prise

L'apparition des premières gouttelettes du lactosérum est observée 30min après l'ajout de Fromase[®]2200TL, cette valeur est conforme à celle de la présure qui est comprise entre 25 et 30min (**FAO, 1990**).

D'après **Adoui, (2007)**, le temps de prise est influencé par la variation du pH et la température, mais d'une manière générale les facteurs influençant la coagulation du lait en addition à la température et le pH, sont principalement la concentration d'enzyme, la teneur en calcium et la dimension des micelles (**Li et Dalgleish, 2006**).

II.7.cinétique d'acidification et de croissance

a. Cinétique d'acidification

L'un des caractères technologiques essentiels des bactéries lactiques est leurs aptitudes à l'acidification du lait qui dépend de leur capacité à la fermentation du lactose et de la résistance à l'acide développé dans le lait. Elles participent également à la texture (production des EPS) et à la saveur des produits laitiers (**Moroni, 2007**).

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des souches Ma₁ et 19D en culture mixte en fonction de temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité titrable par la soude.

Les figures 06 et 07 montrent l'évolution du pH et d'acidité lors de la coagulation du lait inoculé avec les ferments lactiques Ma₁et 19D.

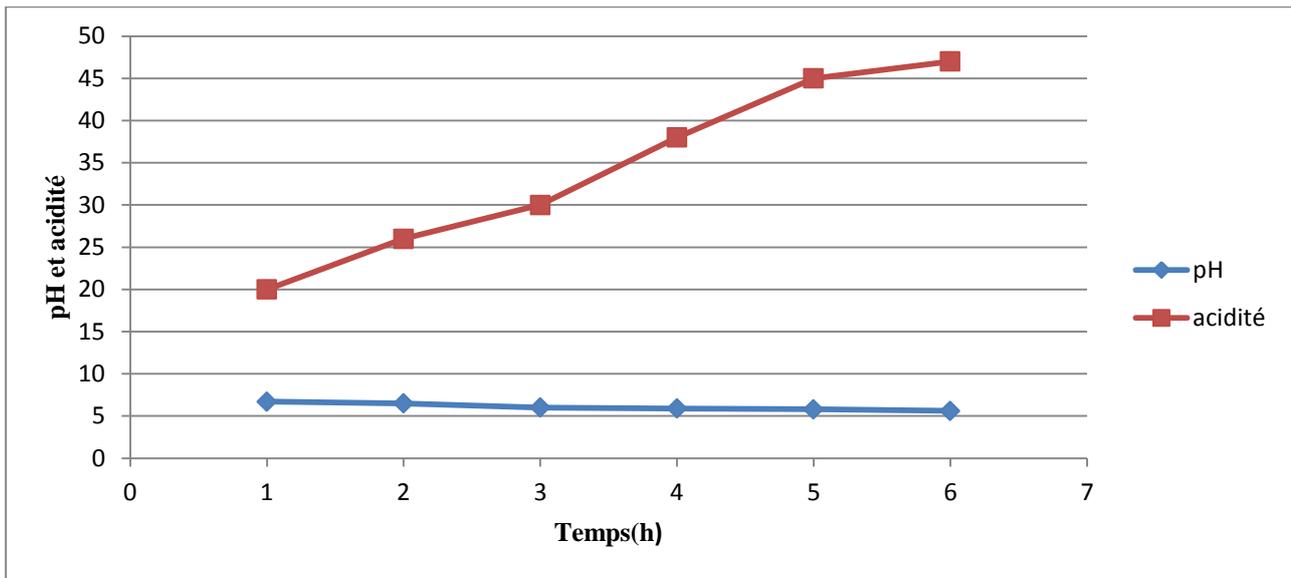


Figure 06. Cinétique d'évolution du pH et d'acidité de bactéries (Ma_1 et 19D) libres cultivées sur milieu lait à 30°C.

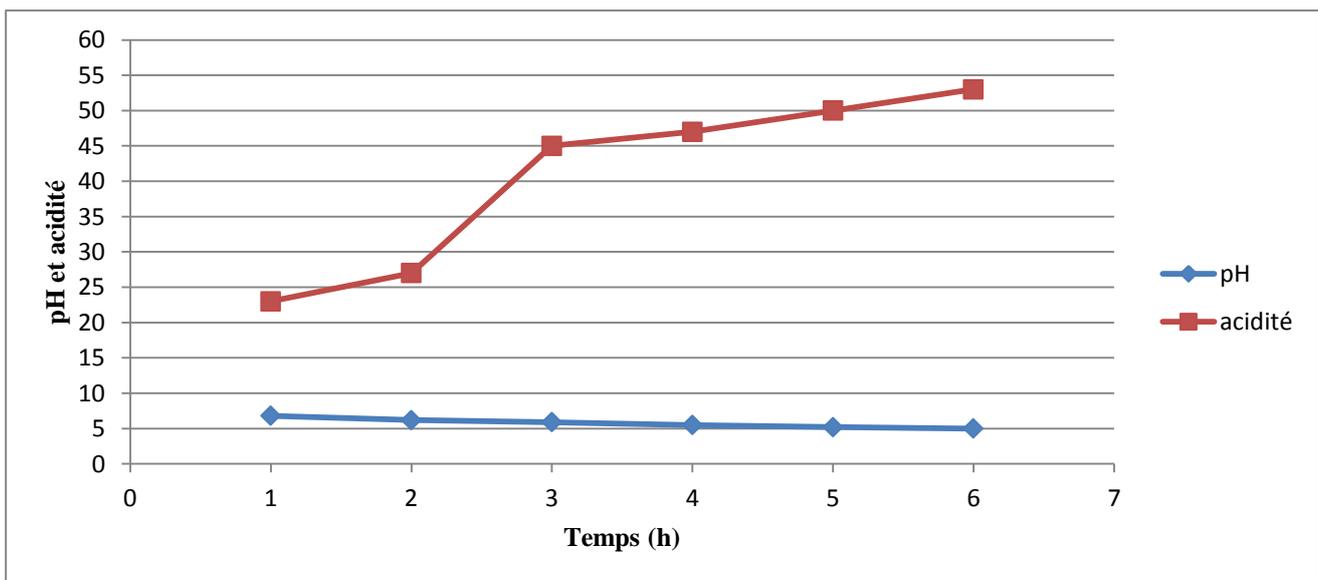


Figure 07. Cinétique d'évolution du pH et d'acidité de bactéries (Ma_1 et 19D) fixées cultivées sur milieu lait à 30°C.

D'après les courbes d'évolution du pH et de l'acidité Dornic on observe que le pH a diminué progressivement en fonction du temps de 6.7 à 5.3 pour les ferments libres, et de 6.7 à 5 pour les ferments fixés, par contre l'acidité Dornic a augmenté de 23°D jusqu'au 47°D pour les ferments libres et 23°D à 53°D pour les ferments Fixés, cette augmentation est due à la transformation du lactose en acide lactique par les ferments.

La valeur maximale de l'acidité trouvée pour les ferments fixés est proche à celle trouvée par **Lagraa et al., 2017** soit 45°D

D'après les figures 06 et 07 on remarque que cette quantité produite par les souches fixées est assez importante et que le pH a diminué d'une manière très rapide par rapport aux souches libres.

Le suivi de la cinétique d'acidification et l'évolution du pH dans des conditions mésophiles des cultures mixtes nous a permis de conclure que le temps d'incubation et l'immobilisation ont influencé positivement sur la croissance des souches.

Cette amélioration de la capacité acidifiante des souches utilisées est due essentiellement à la formation des biofilms qui permettent l'attachement des cellules à la surface du support (argile) (**Prigent-Combret et al., 2001**).

b. Cinétique de croissance

Le suivi de la croissance des souches fixées et libres est réalisé par la technique de dénombrement de micro-spots sur milieu MRS solide.

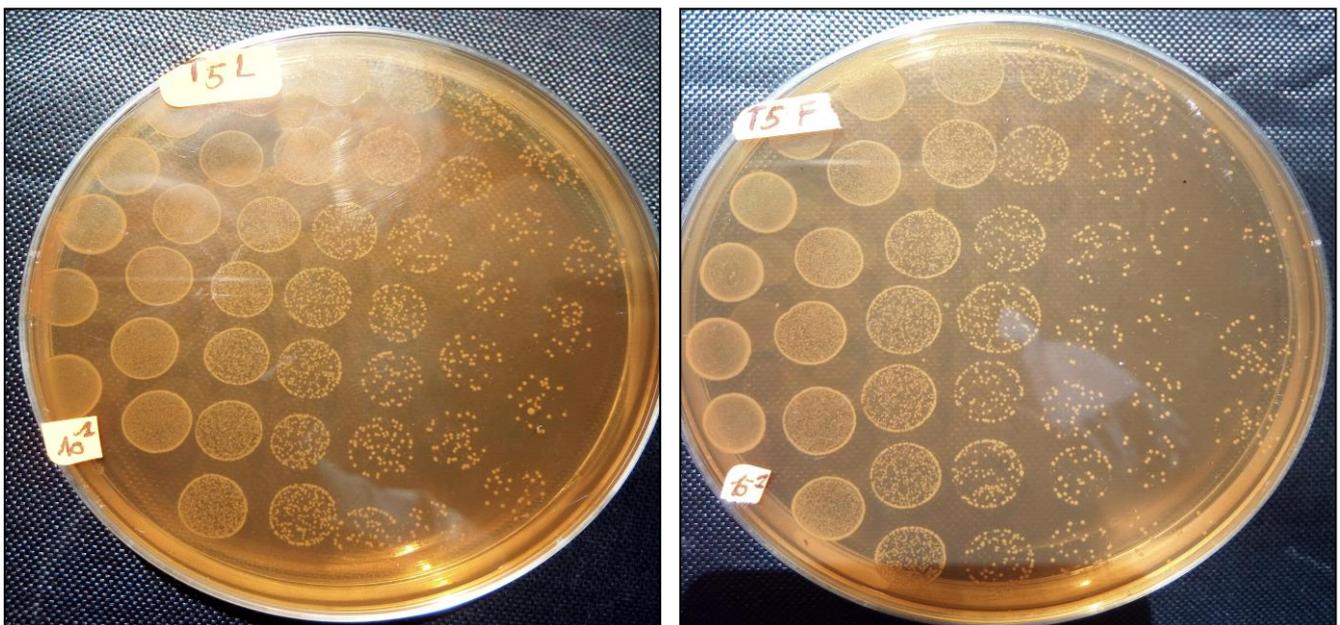


Photo 07. Aspect des colonies sur milieu MRS solide après incubation 24h à 30°C. (L : souches libres, F : souches fixées)

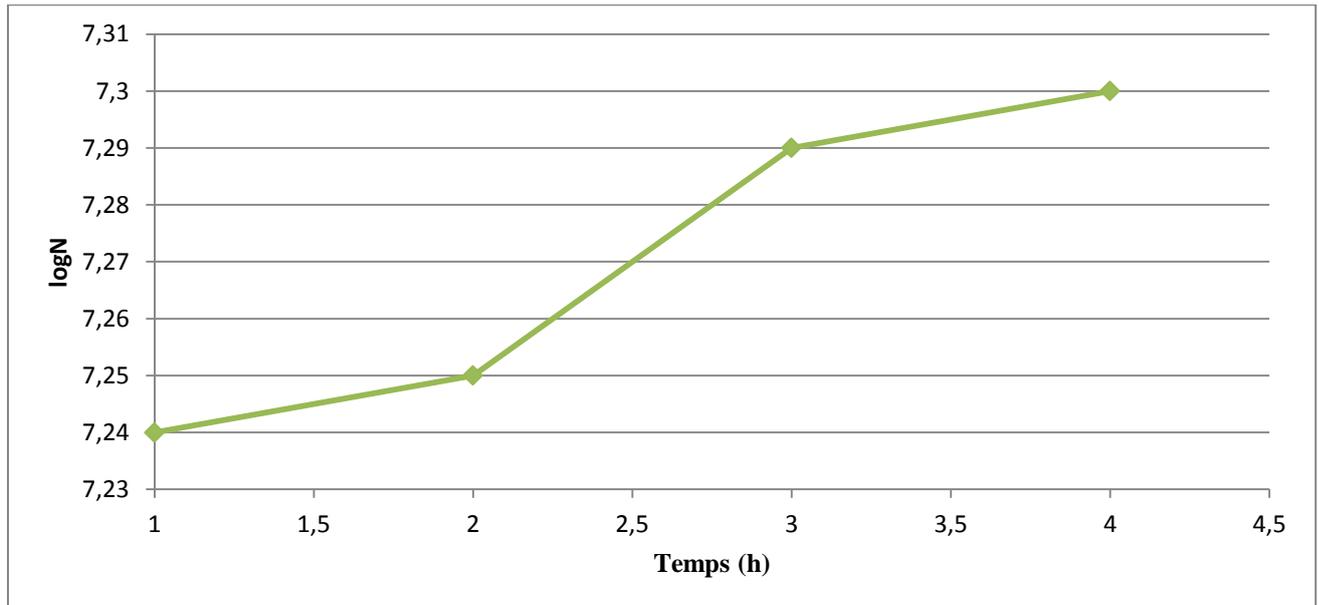


Figure 08. Cinétique de croissance des souches *Lactococcus* et *Leuconstoc* libres dans le lait.

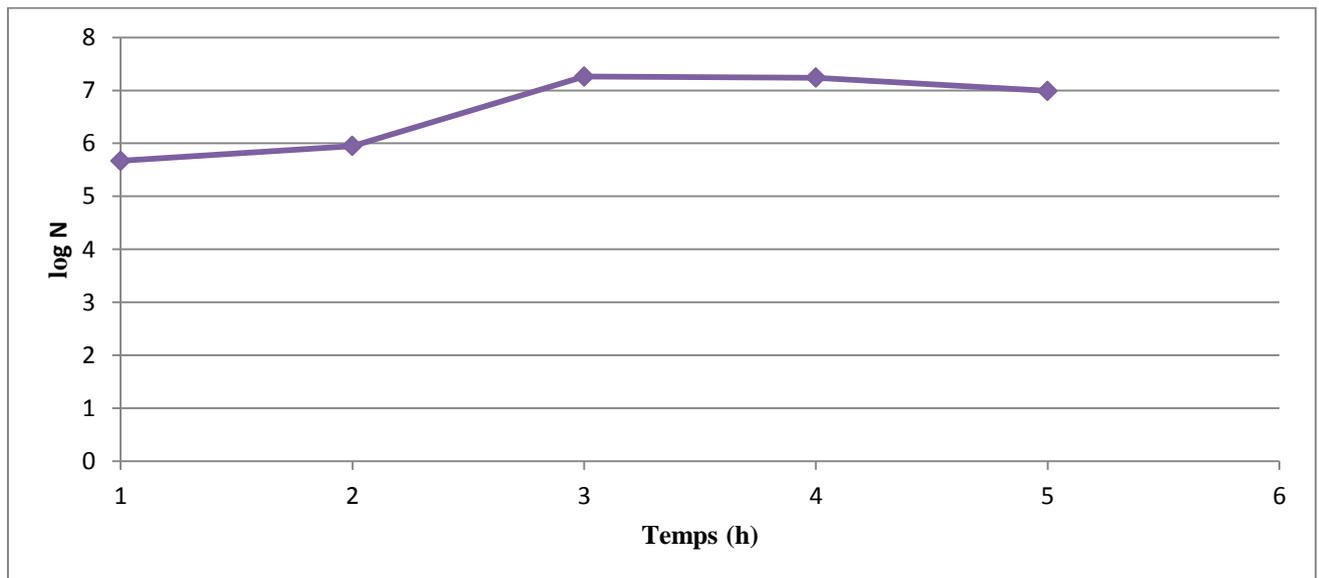


Figure 09. Cinétique de croissance des souches *Lactococcus* et *Leuconstoc* fixées dans le lait.

L'étude de la cinétique de croissance des souches *Lactococcus diacétylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* exprimée en UFC/ml en deux cultures mixtes (fixée et libre) est réalisée dans le lait entier. Le dénombrement s'effectue à un intervalle de temps régulier.

D’après les figures 08 et 09 on remarque que la croissance bactérienne pour les deux cultures se déroule selon un schéma classique d’une culture discontinue avec une absence de la phase de latence, cette absence est expliquée par la préadaptation des souches au lait écrémé durant 24h d’incubation du prés-cultures.

Chez les bactéries lactiques fixées, la croissance est débutée par une phase d’accélération après 1h d’incubation avec une concentration de 5×10^5 UFC/ml, tandis que chez les bactéries libres soit 1.2×10^7 UFC/ml.

Ce stade est suivi par une phase exponentielle, c’est la phase la plus excellente physiologiquement, durant laquelle le taux de croissance est maximal (μ_{max}) (ferments fixés : 3×10^7 UFC/ml, ferments libres 2×10^7 UFC/ml).

L’évolution du nombre des cellules est ordonnée par les conditions optimales : température, pH, source de carbone, et l’O₂ (Saelee et Sriroth, 2014).

II.8. Analyses physico-chimiques de fromages

Les résultats des analyses physico-chimiques de trois types de fromages préparés sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 06 : Résultats des analyses physico-chimiques du fromage.

Type de fromage Paramètre	Type I	Type II	Type III
pH	4.8	4.5	4.2
Acidité titrable (°D)	126	127	130

a. pH

Selon les résultats montrés dans le tableau 06 les trois types des fromages frais fabriqués possèdent un pH acide avec des valeurs allant de 4.2 à 4.8.

L’abaissement de ce dernier est dû à l’activité acidifiante des ferments lactiques employés à travers la production des acides organiques à titre d’exemple l’acide lactique et l’acide acétique... etc.

La variation des valeurs de pH des fromages entre eux est à cause de l’immobilisation ou non des agents coagulants.

Lorsqu’on compare nos résultats avec ceux obtenus par **Rhiat et al., 2011** qui ont utilisé la présure, on observe que sont semblables.

b. Acidité titrable

Les résultats de l'acidité Dornic que nous avons obtenu se situent dans un intervalle de 126 et 130°D.

Il existe une relation inversement proportionnelle entre le pH et l'acidité (Sina, 1992). D'après nos résultats on remarque que cette relation est affirmée.

c. Rendement fromager

Les résultats de rendement fromager sont emportés dans le tableau 07.

Tableau 07 : Rendements fromager de trois types de fromage

Types de fromage	Type I	Type II	Type III
Rendement fromager	22.06	20.2	18.9

Selon Eck et Gillis, (1997), le rendement fromager correspond à l'expression mathématique de quantité du fromage obtenu à partir d'une quantité du lait donné.

D'après les valeurs trouvées des rendements fromagers, nous remarquons qu'il n'y a pas des différences importantes entre les trois types préparés, il est à noter que le rendement le plus élevé est constaté dans le type I où les deux agents coagulants sont libres par contre le rendement le plus faible est enregistré pour le type III où les deux agents coagulants sont fixes.

Ces résultats trouvés ne sont pas conformes aux résultats trouvés par Lagraa et al., 2016 qui ont travaillé par la Chymosine libre et les ferments fixés.

Selon Bank et al., (1984); Gelais et al., (2002) cette différence est expliquée par la quantité du lactosérum évacué durant l'égouttage et la composition de la matière première en protéines et matière grasse dont ; toute augmentation du taux protéique est favorable au rendement plus précisément, la teneur en caséine

Le faible rendement est du à l'activité protéolytique non-spécifique élevée au cours de la coagulation peut donner naissance à des peptides qui seront perdus en solution (salage en saumure) provoquant la réduction de rendement fromager. Toutefois, il a été démontré que la plus part des enzymes coagulantes provoquent des pertes dans le rendement comparées à la présure (Emmons et al., 1990; Barbano et Rasmussen, 1992).

Analyses organoleptiques des fromages frais fabriqués

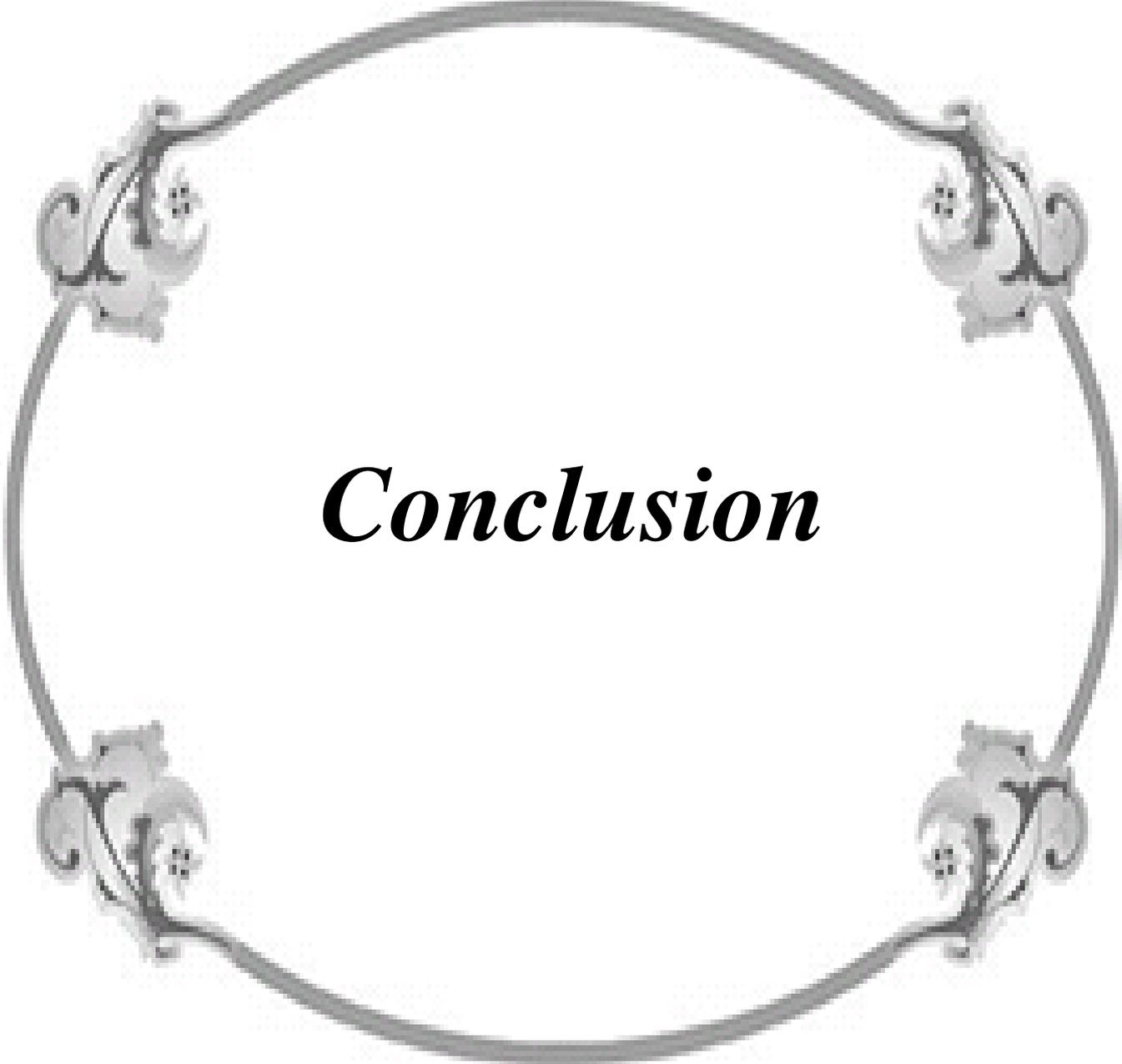
Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 08 qui indique les pourcentages de chaque caractère.

Tableau 08 : Appréciation sensorielle de trois types de fromage frais fabriqués

Type de fromage		Fromage type I	Fromage type II	Fromage type III
Caractère étudié				
Couleur	Jaunâtre	00%	00%	15%
	Jaune crème	23%	15%	15%
	Crème claire	7%	7.6%	7%
	Blanchâtre	69%	76%	61%
Aspect	Hydrant	38%	69%	61%
	Normal	61%	30%	38%
Texture	Ferme	15%	00%	7%
	Granulé	76%	69%	84%
	Souple	00%	30%	00%
	Onctueuse	7.6%	00%	00%
Goût	Très bon	38%	40%	38%
	Bon	61%	38%	53%
	Acide	00%	6%	00%
	Acceptable	00%	15%	7.6%
Odeur	Lait cru	46%	46%	46%
	Beurre	23%	15%	15%
	Fromage	15%	30%	15%
	L'ben	15%	7%	23%
Appréciation globale		Bon	Très bon avec légèreté acide	Bon

La qualité sensorielle des fromages frais varie en fonction de l'immobilisation ou non des agents coagulants.

L'évaluation sensorielle des trois types de fromages a signalé des différences entre celui préparés par des ferments fixés en combinaison à l'enzyme libre qui a été jugé plus ou moins acide par rapport aux deux autre types. Dont l'ensemble ; aucun type des fromages présentés aux dégustateurs n'a été jugé de mauvaise qualité.



Conclusion

Conclusion

Dans le cadre de la recherche des bonnes qualités organoleptiques et physicochimiques du fromage et une meilleure coagulation du lait et afin d'optimiser l'activité enzymatique d'une part et les levains lactiques d'autre part, nous avons contribué à la fabrication de trois types de fromages par coagulation mixte, dans ce contexte une technique d'immobilisation des agents coagulants par adsorption sur l'argile a été effectuée.

Les tests de la ré-identification, confirment que les isolats utilisés sont tous Gram positif, sous forme des coques associant en diplocoques ou en courtes chainettes, catalase négative, homofermentaires pour les lactocoques et hétérofermentaires pour les leuconostocs.

D'autre part, les analyses physicochimiques du lait entier utilisé pour la fabrication de trois types de fromage frais sont dans les normes, avec un pH (6.7) et une acidité (20°D).

La caractérisation de la Fromase[®] 2200TL nous a montré qu'elle possède un temps de floculation de 337sec, une activité coagulante de 29.67unité/ml et une force coagulante de 1/7121.66, et absorbe à une longueur maximale 274nm.

Le suivi de la cinétique d'acidité et de la croissance des ferments lactiques au cours de la fabrication des trois types de fromage frais montre que l'acidité Dornic augmente proportionnellement avec l'accroissement du nombre de cellules, alors que l'évolution du pH est inversement proportionnelle à celle du nombre des cellules bactérienne.

En ce qui concerne l'évaluation sensorielle, la plus part des personnes interrogées jugent que les trois types de fromages fabriqués sont de bonne qualité organoleptiques, et se distinguent par une couleur blanchâtre, une odeur de lait cru, une texture granulée, un aspect hydratant pour les fromages de type II et III et normal pour le type I, à l'exception de type II qui se caractérise par une légère acidité

Quand le rendement fromager les valeurs trouvées ne présentent pas des différences significatives

Suite aux résultats trouvés nous pensons à compléter ce travail par des recherches qui traitent les points suivants :

- .la production des biofilms par d'autres bactéries lactiques immobilisées;
- .fabrication d'autres produits laitiers ;
- .choisir une autre méthode d'immobilisation.

*Références
bibliographiques*

- **Adoui F. (2007).** Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir de proventricules de poulet. Mémoire de Magister. Université MENTOURI: institut de la nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires. Constantine.P39.
- **AFNOR, (1986).** lait et produits laitiers : méthode d'analyse, AFNOR, Paris,
- **Alais C. et Lagrange A. (1972).** Etude biochimique d'une protéase coagulante produite par *Mucor miehei*.I. activité coagulante et activité protéolytique. Laboratoire de Biochimie Appliquée, université de Nancy.I.F(54). Nancy
- **Alais C. (1974).** Science du lait; principes des techniques laitières, 3^{ème} ed., Publicité Sep, 807p
- **Alais C. (1984).** Science du lait : Principes des techniques laitières (Société d'édition et de promotion agro-alimentaires, industrielles et commerciales)
- **Amiot J., Fournier F., Lebeuf Y., Paquin P. et Simpson R. (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses internationales Polytechnique, Montréal, 1 -73.
- **Aunstrup K., Anderseq EA., Falch. Et Nielsen TK. (1979).** Economics of fermentation process. Dans: Microbial Technolgt, Fermentation Technologie, Vol.2. Pepler H.J. et D. Perlman (eds), Academic Press, New York, NY, États-Uni.
- **Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales (Arabia et Kabile).Int.scien.tech.23 :30,37.
- **Bank., J M., Banks W., Muir D. et Tamime AY. (1984).** A comparison of cheese yields and cheese making efficiency using seasonal and standardized milk. Dairy technology.37: 38- 88.
- **Banon S. et Hardy J. (1991).** Study of acid milk coagulation by an optical method using light reflection. *Jornal of Dairy Research*, 58; 75-84.
- **Belkacemi M. (1993).** Contribution à l'étude des interactions dans le système déchets SOL - EAU (Cas de la décharge d'Oued Smar), Thèse de magister, ENP, Département Environnement.
- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P. 12-426.
- **Bourel G., Henini S., Karntar k ., Oraby., Divies C. et Garmynd., (2001).**Metabolisme sucre citrat chez *Leuconostoc mesenteroides*. Lait 81 :75.82.

- **Bourgeois C-M et Larpent J-P. (1996).** Microbiologie alimentaire. Aliments fermentés et fermentation alimentaires, *Ed Tech et Doc, Lavoisier, 2^{ème} Edition*, Tome 2. Paris : 523p.
- **Brule G et Lenoir J, (1987).** La coagulation du lait in Eck A : le fromage (2^{ème} édition). *Ed TEC & DOC Lavoisier*. Paris. pp.1-20.
- **Bulard E. (2012).** L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire. Thèse de Doctorat. Université Paris-sud, Paris.
- **Carr F J., Chill D. et Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria. Critical Review in Microbiol. 20. 281-370.
- **Cuvellier G.F. (1993)** Production des enzymes in Biotechnologie. Coord Scriban R. 4^{ème} édition *Tec. et Doc. Lavoisier* PP948.
- **Eck A., Gillis J.C. (1997).** Le Fromage, De la science à l'assurance-qualité ; 3^{ème} éd Paris, 891p.
- **Ernesrom C. (1997).** Les agents de transformation du lait dans le fromage de la science de l'assurance qualité, *Edition Lavoisier technique*.
- **Esseghir A. et Ould Aissa B. (2003).** Contribution à l'étude de l'évolution des caractères physico-chimiques, microbiologiques et organoleptiques des camemberts préparés avec du lait reconstitué écrémé au cours de l'affinage. Mémoire d'ingénieur d'état en génie biologique. Université de Mostaganem .P :4,11, 28, 29, 34.
- **FAO/OMS, 1990.** le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Rome, Rome, 70 pages.
- **Farkyen Y. (2004).** Cheese technology. *Int. J. Dairy Tech.*, 57, 91-98.
- **Gelais-st D., Tirard-Collet P., Belonger G., Couture R. et Drapeau R. (2002).** Fromage. In. Presses Internationales Polytechniques. Québec-Canada.
- **Guessas B. et Kihal M., (2004).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone : raw goats 'milk. *African Journal of Biotechnology*. 3 (6):339 -342.
- **Guiraud J.P.(1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris : p 652.
- **Harbutt J. (2014).** Le Grande livre des fromages. *Edition Millan*. France. p352.
- **Hadef S. (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques Des bactéries lactiques locales.
- **Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Djilali B. (2009).** Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environ. Congrès international BIOMEDI Marrakech* : 37-5

- **Hassan AN. et Frank J.F. (2001).** Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) *2e Ed.*, Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.
- **Henri G., Bénédicte C., Jean-Yves G. et Pierre S.(2008).** Procédés De Transformation Fromagère - Partie1, Pp 305.
- **Ismaili M.A., Guilal J., Hamama A., Saidi B. et Zahar., M. (2016).** Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *The International Journal of Multi- disciplinary Sciences*, 1(1): 81-94.
- **Jarmul I., Repos A., Poznanski S. et Zelazowaska H. (1982).** utilisation du mélange de la pepsine avec la préparation microbienne « Fromase» dans la fabrication des fromages Edam et Kortowski. *le lait*, 62: 75-86.
- **Jeant R., Crgeunnec PS. et Brulé G. (2007)** .Science des aliment biochimie, microbiologie-procédés – produits, Technologie des Produit alimentaire. *Edition Tec et Doc Lavoisier* .2.456p.
- **Karel SF., Libicki SB. et Robertson CR (1985).** The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chem Eng Science* 40:8:1321-1354.
- **Kihal M. (1996).** Études de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu. Thèse de Doctorat d'État, Université d'Oran.
- **Kihal M., Prevost H., Henni D.E., Benmechernene Z. et Diviès C. (2009).** Carbon dioxide production by *Leuconostoc mesenteroides* grown in single and mixed culture with *Lactococcus lactis* in skim milk. *Scientific Research and Essay*.4 (11): 1348-1353.
- **Kouniba A., Berrada M. et El Marrakchi A. (2007).** Etude comparative de la composition chimique du lait de chèvre de la race locale marocaine et la race alpine et évaluation de leur aptitude fromagère, *Revue Méd. vét.*, 2007, 158, 03, 152-160 :p153-154.
- **Kourkoutas Y., Bekatourou A., Banat IM., Marchant R. et Koutinas AA. (2004)** Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production : a review. *Food Microbiol* 21:377-397.
- **Larpent J.P. (1997).** Mémento technique de microbiologie *.3^{ème} Ed.* Technique et Documentation *Lavoisier*. Paris. 910 pages.
- **Li J., Dalglish D. (2006).** Mixed coagulation of milk gel formation and mechanism. *J. Agric. Food Chem*, 54, 4687–4695.
- **Luquet F.M. et Corrieu G. (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. *Edit. Tech. Doc.*

- **Mahaut M., Jeantet R. et Brule G. (2000).** Initiation à la recherche fromagère. Edition : *Tec et Doc. Lavoisier. Paris.*
- **Marchal N., Bourdon J.L. et Richard CL. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3^{ème} Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- **Margaritis A. et Merchant FJA. (1984).**Advances in ethanol production using immobilized cell systems. Crit .Rev. biotechnol .1(4).339.
- **Marti B. et Coulon JB. 1995.** Milk production and characteristics.1-influence of milk product condition on herd milk coltting ability. *Le lait*, 75(3), 61-68.
- **Mathieu J. (1998).** Initiation à la physicochimie du lait, guide technologique des industries agroalimentaire. *Edition : Tec et Doc Lavoisier. Vol 220.*
- **Moroni O. (2007).** Contribution à l'étude du rôle des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections entériques à *Lesteria monocytogenes*: analyse in vitro et étude in vivo des mécanismes d'action antimicrobien. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval.146p.
- **Moulay M., Benlahcen K., Aggad H. et Kihal M. (2013).** Diversity And Technological Properties of Predominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk. *Advances in Environmental Biology*, 7(6): 999-1007.
- **Moulay M., Hadj Said A., Hocine L. et Kihal M. (2016).** Immobilization of Lactic Acid Bacteria On Bentonite Clay Particules of Maghnia Region West-Algerian. *Laboratory of hygiene and animal pathology, institue of Veterinary Sciences, University Ibn Khaldoun BP78 Zaaroura Tiarert-Algeria.*
- **Prigent-Combaret C., Brombacher E., Vidal O., Ambert A., Lejeune P., Landini P. et Dorel C. (2001).**Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in *Escherichia coli* via Regulation of the D Gene. *J Bacteriol* 183, 7213–7223.
- **Ramet JP. (2006).** L'égouttage du coagulum in fromage (3^{édition}). *Lavoisier TEC et DOC.* Paris. pp, 42-61.
- **Saelee N. et Ssriroth K. (2014).** Optimization of nutrients in fermentative lactic acid production using oil palm trunk juice as substrate. *Advances in Bioscience and Biotechnology*5: 957-965.
- **Sina L. (1992).** Contrôle de la qualité du lait et produits laitiers fabriqués par la SOCA. Thèse: Méd. Vét: Dakar; N°33, 73p.
- **Singleton P. (1999).** Bactériologie.4^{ème} Edition. Dunod, Paris. 317 pages.

- **Strehaiano P., Ramon Portugal F. et Taillandier P. (2006).** “Yeasts as biocatalysts” dans: The Yeast Handbook vol.2: Yeasts in food and beverages, Querol A. et Fleet G. Eds Springer, 243-283.
- **Stéphanie V. (2005).** Immobilisation d’enzymes dans des hydroxydes Doubles lamellaires. Réalisation de Biocapteur pour la détection de polluants organiques. Thèse de Doctorat. université Blaise Pascale.
- **Vignola C. (2002).** Sciences et technologies du lait, transformation de lait. Ecole polytechnique de Montréal, 599p.

Annexes

Annexe 01 : Composition des milieux de culture

Milieu M17 (Ouahghiri, 2009)

- Tryptone.....	2,50 g
- Peptone pepsique de viande	2,50 g
- Peptone papainique de soja	5,00 g
- Extrait autolytique de levure.....	2,50 g
- Extrait de viande	5,00 g
- Lactose	5,00 g
- Glycérophosphate de sodium	19,00 g
- Sulfate de magnésium	0,25 g
- Acide ascorbique	0,50 g
- Agar bactériologique.....	15,00 g

Milieu M17 (TERZAGHI et SANDINE, 1974) :

Peptone papainique de soja.....	5 g
β-Glycérophosphate de sodium	19 g
Peptone pepsique de viande.....	2,5 g
Sulfate de magnésium,7H ₂ O.....	0,25 g
Peptone trypsique de caséine.....	2,5 g
Acide ascorbique.....	0,50 g
Extrait de viande.....	5 g
Agar-agar.....	15 g
Extrait de levure	2,5 g
Eau distillée.....	950ml

Le milieu est stérilisé à 121°C durant 15 min. La solution de lactose est préparée dans l'eau distillée à raison de 5 g dans 50 ml Elle est stérilisée à 110 °C durant 15 min et ajoutée au milieu.

Milieu MRS (Man et al., 1960):

Peptone	10 g
Acétate de sodium.....	5 g
Extrait de viande.....	10 g
Citrate d'ammonium.....	2 g
Extrait de levure.....	5 g
Sulfate de magnésium.....	2 g
Tween 80.....	1 ml
Sulfate de manganèse.....	0,005 g
Phosphate dipotassique.....	2 g
Agar-agar	5 g
Eau distillée 800 ml	

Le milieu est stérilisé à 121°C durant 15 mn à l'autoclave. 20 g de glucose sont dissous dans 200 ml d'eau distillée, stérilisés à 110 °C durant 15 min et ajouté au milieu.

Eau physiologique

Chlorure de sodium.....8,5 g
Peptone0,5 g
Eau distillée.....1000 ml
pH..... 7,0
Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Lait écrémé

Lait en poudre.....110 g
Eau distillée..... 1000 ml
Extrait de levure3g
Autoclavage 110°C pendant 10 minute

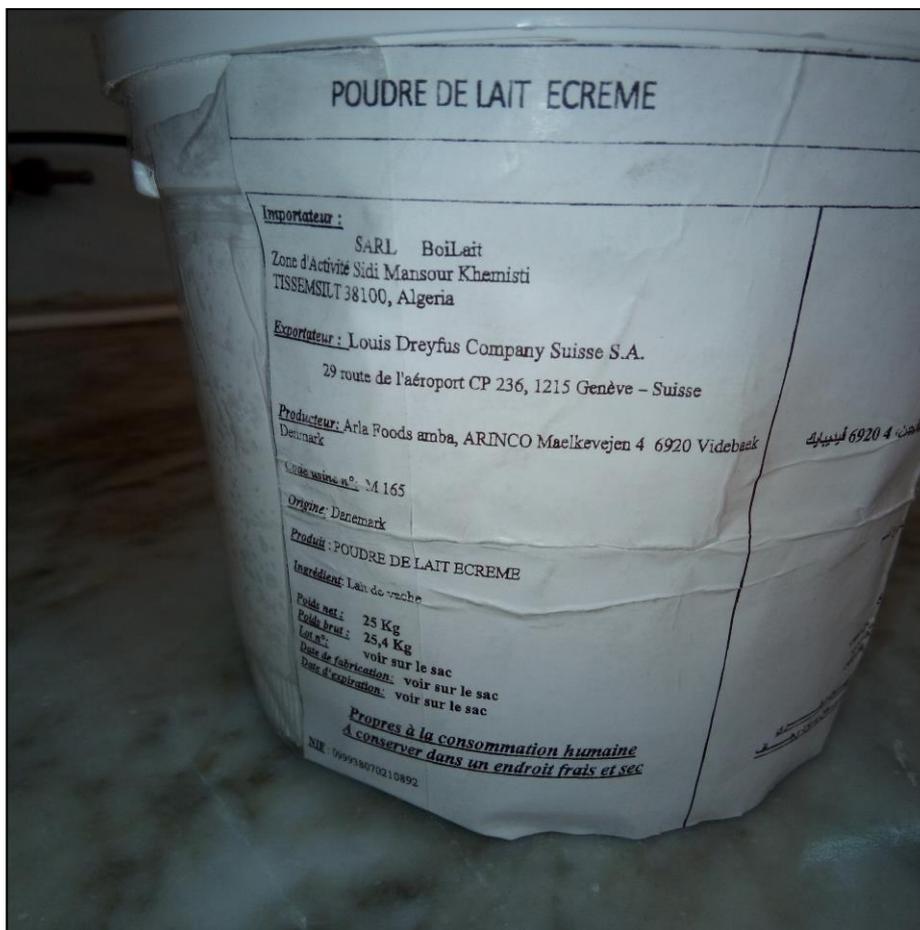


Photo 08 : lait écrémé en poudre

Annexe 02: Coloration de Gram

Selon **Snouci et al., (2010)**.

1. Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;
2. Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène ;
3. Couvrir le frottis par du violet de gentiane pendant 60 secondes ;
4. Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée ;
5. Couvrir de lugol pendant 30 secondes ;
6. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes ;
7. Rincer immédiatement le frottis avec l'alcool en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette ;
8. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes ;
9. Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes ;
10. Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes ;
11. Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram positives absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram négatives qui apparaissent distinctement rosâtres.

Annexe 03 : Standardisation Mc Farland

Le standard Mc Farland 5.0 correspond approximativement a une suspension homogène des bactéries de 1.5×10^9 cellules par ml (**Forbes et al ., 1998**).

- **Mode opératoire**

- Prélever à l'aide d'une micropipette stérile 1 ml à partir d'une culture bactérienne jeune

(Après 24h d'incubation à 30°C).

- Transverser dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile.

- Ajuster la densité de la solution bactérienne « inoculum » à celle de 5.0 Mc Farland à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 625 nm

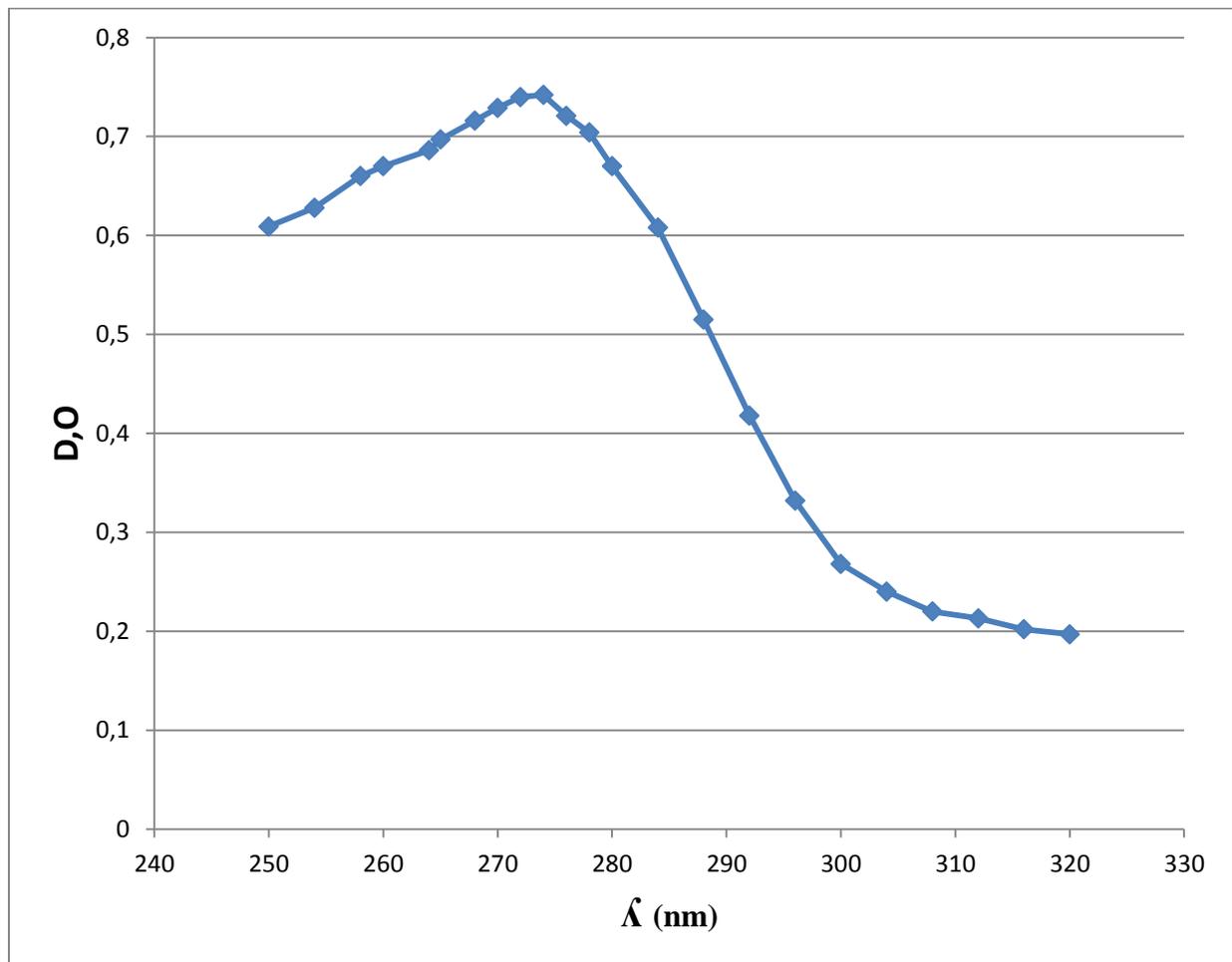
- l'absorbance de la suspension bactérienne, à la longueur d'onde de **625** nm doit être comprise entre **0,8** à **1**.

Solution standard 5,0 Mc Ferland

Chlorure de barium solution de 0,048M5,0 ml

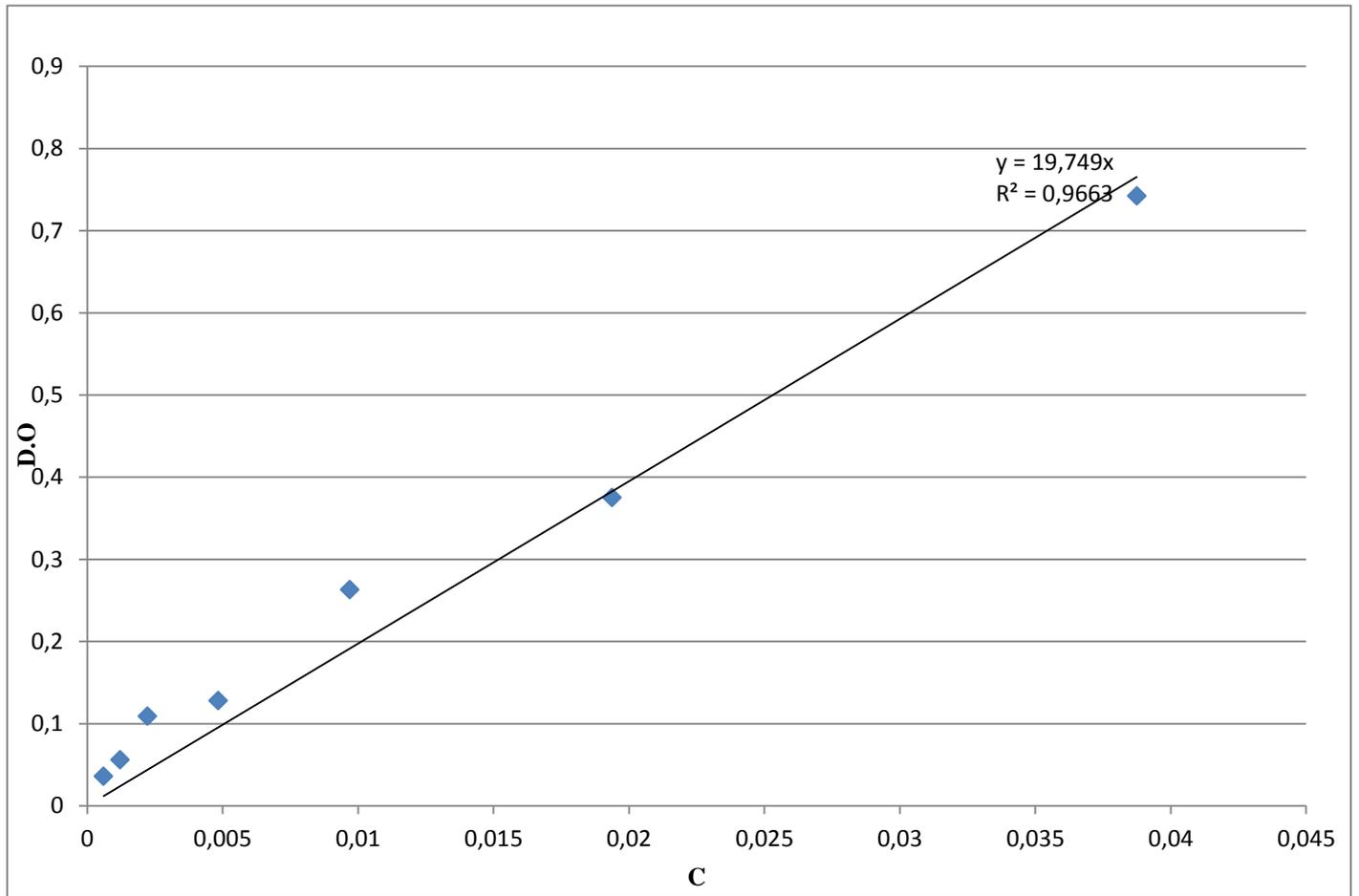
Acide sulfurique, solution de 0,18M95,0 ml

Annexe 04 : Détermination de la longueur d'onde du Fromase[®] 2200TL



Courbe de détermination de la longueur d'onde du Fromase[®] 2200TL.

Annexe 05 : courbe d'étalonnage de Fromase[®] 2200TL



Courbe d'étalonnage de la Fromase[®]2200TL

Annexe 06 : purification de l'argile



1-Agitation pendant 2h



4-Filtration sous vide



2-Repos 24h



5-Stabilisation du poids de papier filtre



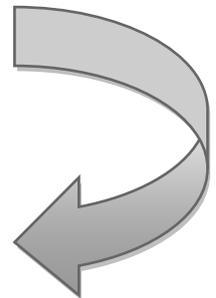
3-siphonnage



6-Détermination du poids du papier filtre

Les étapes de la purification d'argile

Annexe 07: fabrication du fromage



Les étapes de la fabrication des fromages frais.

Annexe 08 : Enzyme Fromase® 2200TL



Fromasa®2200 TL granulate

PRODUCT INFORMATION

Technological processing aid – Enzymic preparation

Fromasa®2200 TL granulate

Product description

Fromasa®2200 TL granulate is acid protease, manufactured from a selected strain of *Rhizomucor miehei*. Fromasa®2200 TL granulate causes the process of coagulation of milk by hydrolytic cleavage of the bond 105-106 (phenylalanine – methionine) in kappa-casein.

Area of application

It is used in the dairy industry in the production of cheeses, cottage cheese, and cottage cheese products.

Dosage

Cheese: 12-15 g for 1,000 kg of milk mixture. The dosage is selected individually during the year, proceeding from the following condition: to complete the coagulation of protein within (35±5) minutes. The dosage may vary depending on the region, time of the year, and quality indicators of the raw milk.

Curd cheese: 0.4-0.5 g for 1,000 kg of milk mixture.

Physical and chemical indicators

Milk-clotting activity, *IMCU/g, no less than	2,200
Dry matter, %, no more than	94

* IMCU - International Milk Clotting Units

Organoleptic indicators

Appearance	Granulated powder
Colour	Cream to light brown

Technological recommendations

1. Prepare an aqueous solution of the formulation having the desired activity (use sterile and chlorine-free water, with a temperature of 30-35 °C). Use labware (a vessel and mixing spatula) of a polymeric material or stainless steel;
2. Mix the solution thoroughly;
3. Keep the solution for some time to allow the enzyme swell;
4. The enzyme solution should be introduced into the milk mixture, while distributing it over the whole surface of the cheesemaker bath and stirring the milk mixture at a high speed.

Advantages

- It is a product of natural origin and does not contain GMOs.

- It does not contain pepsin, which increases the predictability of the cheese ripening process and contributes to further standardising of the yield and quality of cheese.
- As an enzyme of animal origin, it is sensitive to the concentration of calcium ions.
- It allows making cheese satisfying the demands of consumers of kosher, halal, or vegetarian food.
- It does not affect the performance of the starter culture.
- In contrast to enzymes of animal origin, it is free from resource dependency, which is indicative of a stable commercial interest.

Microbiological indicators

Number of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms (QMA&OAMO), CFU/g, no more than	5x10 ⁴
Coliform bacteria (coliforms), not allowed, g	0.1
Pathogenic microorganisms, including Salmonella, not allowed, g	25
E. coli, not allowed, g	25
Contains no viable forms of producers. Has no antibiotic activity	

Safety indicators

In terms of safety indicators, Fromasa®2200 TL granulate complies with Article 7(9) of TP TC 029/2012, the Safety Requirements for Food Additives, Flavourings, and Technological Processing Aids.

Storage conditions (stability data)

The product should be stored in original, tightly closed containers. The recommended storage temperature is 4-8 °C. The shelf life under these conditions is 24 months, during which the activity decreases by less than 5% per year.

Packaging

Hermetically sealed 0.5 kg container from plastic suitable for contact with food.

Manufacturer

DSM Food Specialties Dairy Ingredients. France.

Status

The product has a status of a kosher and halal formulation.

Annexe 09: lait entier



Photo 09 : lait entier en poudre (25%)

Annexe 10: Appréciation sensorielle de fromage

Type de fromage		Fromage type I	Fromage type II	Fromage type III
Caractère étudié				
Couleur	Jaunâtre			
	Jaune crème			
	Crème claire			
	Blanchâtre			
Aspect	Hydrant			
	Normal			
Texture	Ferme			
	Granulé			
	Souple			
	Onctueuse			
Goût	Très bon			
	Bon			
	Acide			
	Acceptable			
Odeur	Lait cru			
	Beurre			
	Fromage			
	L'ben			
Appréciation globale				

Annexe 11 : fixation des bactéries lactiques (Ma1 et 19D) sur l'argile

D.O des bactéries avant et après fixation				
Souches	Ma1		19D	
	standardisation	Après fixation	standardisation	Après fixation
Essai 01	0.984	0.410	.909	0.485
Essai 02	0.988	0.368	0.923	0.207
Essai 03	0.875	0.365	0.957	0.228
Essai 04	1.041	0.475	0.967	0.248
Moyenne	0.971	0.404	0.975	0.301

Annexe 12 : fixation de l'enzyme Fromase[®] 2200TL sur l'argile

C	0.155	1/2	1/4
D.O	2,268	0,9435	0,478

Résumé

Le but de notre travail est l'essai de fabrication de trois types de fromage frais sous l'action combinée d'une enzyme (Fromase®2200TL) et les ferments lactiques (*Lactococcus diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides*) à partir du lait entier à savoir : ferments, enzyme libres, les deux fixés, ferments fixés et enzyme libre et de voir l'effet de l'immobilisation des agents coagulants sur le rendement fromager et la qualité organoleptique.

La ré-identification des souches *Lactococcus diacetylactis* (Ma₁) et *Leuconostoc mesenteroides* (19D) par des tests morphologiques et biochimiques, nous a permis de ressortir les points suivants : les isolats sont des cellules Gram positives du forme rondes, lenticulaires et de couleur blanchâtre, leur arrangement isolés, diplocoques et en courtes chainettes, avec une catalase négative.

Et à lumière des résultats de test biochimique, le type fermentaire de *Lactococcus est* homofermentaires tandis que *Leuconostoc* est hétérofermentaires.

La Fromase®2200TL possède un temps de floculation de 337sec, une activité coagulante de 29.67unité/ml et une force coagulante de 1/7121.66, et a eu une absorbance maximale à une longueur d'onde de 274nm.

Au bout d'un intervalle de temps régulier d'incubation, le pH atteint une valeur maximale de 5.3 pour les ferments libres, par rapport aux ferments fixés qui ont baissé le pH jusqu'à 5 et l'acidité Dornic arrive respectivement à 47°D et 53°D.

Nos fromages frais ont été jugés par les dégustateurs comme étant blanchâtre majoritairement avec une odeur du lait cru et aspect hydratant, une texture granulée et d'un gout très bon.

Mots clé : lait entier, fromage frais, Fromase®2200TL, ferments lactiques (*Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*), argile, immobilisation.

ملخص

الهدف من العمل الذي قمنا به هو محاولة تحضير ثلاثة انواع من الجبن الطازج بإضافة مخمرات اللبن (*Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*) و انزيم ال Fromase®2200TL الى الحليب المبستر كامل الدسم, وذلك كما يلي: المخمرات والانزيم غير مثبتين, كلاهما مثبت, المخمرات اللبنية مثبتة والانزيم غير مثبت من اجل معرفة تأثير تثبيت عوامل التخمر على مردودية ونوعية الجبن.

النتائج المتحصل عليها بعد اعادة مطابقة العزلات عن طريق الاختبارات المورفولوجية والبيو كيميائية سمحت لنا باستخلاص النقاط التالية: العزلات ايجابية الغرام على شكل مكورات بيضاء معزولة او ذات تموضع ثنائي او علي شكل سلاسل قصيرة, كما انها ذات كتالاز سلبي.

وعلى ضوء نتائج الاختبارات البيو كيميائية فان *Lactococcus* لها نمط تخمر متجانس اما *Leuconostoc* فلها نمط تخمر غير متجانس.

انزيم Fromase® 2200TL لديه وقت تلبد 337 ثانية, نشاط تخثر 29.67 وحدة/مل وقوة تخثر 1/7121.66 ولديه اقصى امتصاص على طول موجة 274 نانومتر.

وفي نهاية الحضان, الرقم الهيدروجيني يصل الى قيمة قصوى 5 بالنسبة للمخمرات اللبنية غير المثبتة, مقارنة بنظيرتها المثبتة والتي يصل الرقم الهيدروجيني عندها الى 5.3 والحموضة 53°D و 47°D على الترتيب.

استنادا على الآراء الحسية للمتذوقين فان الاجبان المصنعة في الغالب بيضاء, ذات رائحة حليب طازج, تبدو رطبة ذات قوام محبب و طعم جيد.

الكلمات المفتاحية: جبن طازج, حليب كامل الدسم, Fromase® 2200TL, مخمرات اللبن *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, الطين, التثبيت.