

# 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:** "Sciences des procédés biotechnologiques et agroalimentaires"

Présenté et soutenu publiquement par

- M<sup>elle</sup> GUERBOUZ Chaima

-M<sup>elle</sup> KHELIFA Nacera

- M<sup>elle</sup> ZABOUR Messaouda

Essai de fabrication d'un fromage frais par coagulation mixte : enzymatique  
(chymosine immobilisée) et lactique (*Leuconostoc mesenteroides* et *Lactococcus*  
*diacetylactis* libres).

## JURY:

-Président: M<sup>elle</sup> MOULAY M.

-Promoteur: M<sup>r</sup> HADJSAID A.

-Co-promoteur: M<sup>r</sup> HOCINE L.

-Examinatrice: M<sup>elle</sup> BENGUIAR.

## Grade

MCB

MCA

MAA

MAA

Année universitaire: 2016–2017



# Remerciement

*Nous remercions ALLAH de nous avoir donné la force et le Courage pour réaliser ce modeste travail.*

*Ce travail n'aurait pu se faire seul ! Ce sont les compétences, la disponibilité, le dynamisme, la bonne humeur et la patience de chacun, qui nous ont permis de poursuivre nos études et d'achever ce mémoire dans les meilleures conditions. C'est pourquoi nous tenons chaleureusement à remercier :*

*Notre promoteur M<sup>r</sup> **HADJSAID A** pour sa disponibilité. Et nous avoir guidées tout au long de la réalisation de ce travail.*

*Je remercie chaleureusement notre Co-promoteur M<sup>r</sup> **HOCINE L** pour son aide, Ses conseils et ses remarques qui m'ont permis de représenter notre Travail dans sa meilleure forme.*

*Je tiens à remercier M<sup>elle</sup> **MOULAY M** pour m'avoir honoré de présider le jury de cette mémoire.*

*J'exprime mes sincères remerciements au M<sup>elle</sup> **BENGIEARE** pour avoir d'examiner ce travail.*

*Nos enseignants de **à l'université de Ibn Khaldoun Tiaret** Pour toute ses assistance que ce Soit durant les cours qu'on a pu partager avec, aussi pour ses conseils Qui ont su booster notre avancement.*

*Nos vifs remerciements vont à nos amies qui ont partagé avec nous nos soucis et nos joies, leur Collaboration ou leur soutien moral ont contribué à la réalisation et à l'achèvement de ce travail.*

*Nous remercions, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*Finalement, nous teints à remercier par une pensée toute particulière à nos parents, qui sont tant apprécie d'voir ce travail termine. Ils sont toujours a cotes de nos.*





# Dédicace

*J'ai toujours pensé faire où offrir quelque chose à mes parents en signe de reconnaissance pour tout ce qu'ils ont consenti comme efforts, rien que pour me voir réussir, et voilà, l'occasion est venue.*

*A ceux qui m'ont donné la vie, symbole de beauté, et de fierté, de sagesse et de patience.*

*Je dédie Ce modeste travail a*

*Mon père a qui je dois le grande amour et le profond respect  
Ma chère mère pour son patient  
J'espère que je Suis la bonne fille que t'as rêvé de l'avoir*

*A mes frères Mohamed, Benaïssa, m'Hamed.  
A Mes très chères sœurs Amîna, fatîma, marwa je vous réserve toujours  
une place dans mon cœur et mes pensées.  
A toute la famille GUERBOUZ et BELMIRAD  
A mes amies Halîma, Hayat, Iman  
A mes tantes et mes oncles  
Et toutes mes amies sans exception, en particulier :*

*Hanan, Fahîma ,Salîma*

*Fatîha, Yasmîna, Lamîa, Nadîa, Houarîa (Service Scolarité)*

*A mon cousin adoré ISMAIL*

*A mes arandes mères que ie souhaite une sannaue et heureuse vie*

*A mon trinômes Messaouda et Nacera et toute sa  
famille.*

**chaima**





## *Dédicaces*

*Nous rendons grâce à ALLAH le tout puissant.*

*Nous vous prions de nous guider sur le droit chemin qui est le votre  
et qui nous mène à votre Paradis. Amen*

*Je dédie ce modeste travail à*

*Mon père Mr. K̄helifa Mohammed*

*Tu es un pilier solide et incontournable pour ma personne et mon  
parcours, que Dieu te donne la santé et longue vie.*

*Ma mère Mme. Moutrimi Oumelk̄heir*

*Que dieu la protège Pour moi, je ne pourrai jamais la remercier assez*

*Pour ce qu'elle fait pour moi.*

*Dieux vous garde tous les deux*

*Mes chers frères et leurs femmes et leurs enfants*

*Mes chères sœurs et leurs maris et leurs enfants*

*Toute ma famille.*

*Ma chère amie et la plus proche à moi Soltana et sa famille.*

*Mon trinômes Messaouda et Chaima et toute sa famille.*

***NACERA***



# Dédicace

*Ames chers parents*

*Je vous dois ce que je suis aujourd'hui grâce à votre amour. A votre patience et votre innombrable sacrifice que ce modeste travaille, soit pour vous une petite compensation et reconnaissance envers ce que vous avez fait pour moi que dieu tout puissant vous préserve et procure santé et longue vie.*

*A mes frères*

*Mohamed, Youcef, Hamza*

*A mes très chères sœurs*

*Sabrina, Mouna, warda*

*Aucune dédicace ne serait exprimer assez profondément ce je ressens envers vous je vous dirais tout simplement un grands merci je vous aime*

*A toute la famille ZABOUR*

*A mon cousin adoré Menad Abd allah*

*A mes chères amies*

*Hanan, Salima ,Fahima*

*En témoignage de sincère qui nous à liées et des bons moments passés ensemble je vous dédie ce travaille en vous souhaitant un avenir radieux et plein de bonnes promesses*

*A mon trinômes Chaïma et Nacera*

**MESSAOUDA**



## Liste des abréviations

**°C** : Degré Celsius.

**°D** : Degré Dornic.

**%** : Pourcentage.

**$\lambda$**  : la longueur d'onde.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de Carbone.

**ENF** : Entreprise Nationale de Fonderie.

**g** : gramme.

**g/L** : gramme par litre.

**GIPLAIT** : Groupe Industriel des Productions Laitières.

**h** : heure.

**H<sub>2</sub>O** : Eau.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène.

**L** : Litre.

**$\mu$ L** : Micro litre.

**min** : Minute.

**mL** : Millilitre.

**mol/L** : mol par litre.

**MRS**: Man-Rogosa-Sharpe.

**$\mu$ m**: micro mètre.

**nm** : nanomètre.

**NaOH** : Hydroxyde de sodium.

**Na Cl** : Chlorure de sodium.

**O<sub>2</sub>**: Oxygène.

**pH** : Potentiel d'Hydrogène.

**RF** : Rendement fromager.

**Lc** : Lactococcus diacetylactis.

**Ln** : Leuconostoc mesenteroides.

**t** : Temps.

**trs** : tours.

**trs/min** : tours par minute.

**T** : Température.

**UP** : Unité présure.

**UAC** : Unité d'Activité Coagulante.

**UFC** : Unité bactérienne Formant Colonie.

**UFC/ $\mu$ l** : Unité bactérienne Formant Colonie par micro litre.

**V** : Volume de lait.

**V'** : Volume de l'extrait enzymatique.

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau 01:</b> matériels utilisés.....	03
<b>Tableau 02 :</b> caractères sensorial.....	23
<b>Tableau 03 :</b> caractérisation de la chymosine libre et fixée.....	28
<b>Tableau 04 :</b> résultats d'analyses physico-chimiques du lait.....	28
<b>Tableau 05:</b> mesure du pH et l'acidité du fromage.....	32
<b>Tableau 06 :</b> Caractères sensoriel.....	33

### **Tableau des annexes**

<b>Tableau 07 :</b> variation du pH des ferments.....	05
<b>Tableau 08 :</b> détermination de l'acidité dornic des ferments.....	06

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : la purification de l'argile.....	05
<b>Figure 02</b> : pré identifications des souches lactiques.....	07
<b>Figure 03</b> : les étapes d'immobilisation de l'enzyme.....	11
<b>Figure 04</b> : la préparation de lait.....	14
<b>Figure 05</b> : le protocole expérimental global.....	15
<b>Figure 06</b> : courbe de variation du pH des ferments lactiques.....	29
<b>Figure 07</b> : la courbe d'évolution de l'acidité dornic.....	30
<b>Figure 08</b> : Courbe de la cinétique de croissance.....	31

## La liste des photos

<b>Photo 01</b> : l'ajout de l'enzyme immobilisée.....	19
<b>Photo 02</b> : coagulation mixte du lait.....	19
<b>Photo 03</b> : tranchage du fromage.....	19
<b>Photo 04</b> : brassage de fromage.....	20
<b>Photo 05</b> : égouttage de fromage.....	20
<b>Photo 06</b> : salage du fromage.....	21
<b>Photo 07</b> : moulage du fromage.....	21
<b>Photo 08</b> : la conservation du fromage.....	21
<b>Photo 09</b> :aspect macroscopique des souches lactiques.....	25
<b>Photo 10</b> : aspect macroscopique des souches lactiques.....	26
<b>Photo 11</b> : Observation microscopique des souches.....	26
<b>Photo 12</b> : test de catalase (catalase- ).....	27
<b>Photo 13</b> : type fermentaires des souches <i>Ln. mesenteroides</i> et <i>Lc. Diacetylactis</i> .....	27
<b>Photo 14</b> : croissance bactérienne sur milieu MRS solide après incubation à 30°C.....	31
<b>Photo des annexes</b>	
<b>Photo 15</b> : préparation de la suspension de l'argile.....	04
<b>Photo 16</b> : agitation de la suspension d'argile pendant 2h.....	04
<b>Photo 17</b> : (A) décantation de la suspension d'argile pendant 24h (B) récupération de surnageant par siphonage.....	04
<b>Photo 18</b> : filtration de la suspension d'argile pompe à vide.....	05
<b>Photo 19</b> : conservation des souches à long et à court terme.....	05
<b>Photo 20</b> : technique de micro spots.....	06
<b>Photo 21</b> : la poudre de lait utilisé.....	06

<b>Photo 22:</b> mesure du pH de lait.....	07
<b>Photo 23 :</b> détermination de la densité du lait.....	07
<b>Photo 24 :</b> détermination de l'acidité dornic de lait.....	07

## SOMMAIRE

- Liste des abréviations
- Liste des tableaux
- Liste des figures
- Liste des photos

### Introduction

## PARTIE EXPERIMENTALE

### Matériels et méthodes

1. objectifs	02
2. lieux et durée de travail	02
3. matériels et méthodes	02
3.1. Matériels et milieux de culture utilisés	02
3.2. Matériels biologiques	03
3.3. Méthodes	03
4. Purification de l'argile	05
5. La pré-identification des souches lactiques	07
5.1. Les bactéries lactiques utilisées	08
5.1.1. <i>Lactococcus diacetylactis</i>	08
5.1.2. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	08
5.2. Activation et purification	08
5.3. Pré-identification	08
5.4. Testes morphologiques	08
5.4.1. Aspect microscopique	08
5.4.1.1. Coloration de gram	08
5.4.2. Aspect macroscopique	09
5.5. Testes biochimiques	09
5.5.1. Catalase	09
5.5.2. Type fermentaire	09
5.6. Conservation	09
5.6.1. Conservation des souches à court terme	09
5.6.2. Conservation des souches à long terme	09
5.7. Standardisation	10
6. L'immobilisation des enzymes	11
6.1. Etapes d'immobilisation de l'enzyme	12
6.2. Détermination des caractéristiques de la coagulation enzymatique	12
6.2.1. temps de floculation	12
6.2.1.1. mode opératoire	12
6.2.2. Activité coagulante	12
6.2.3. La force coagulante	13
7. Préparation du lait	14
8. Protocole expérimentale	15
9. Analyses physico-chimiques du lait	16

9.1. Mesure du pH.....	16
9.1.1. Principe.....	16
9.1.2. Mode d'opérateur.....	16
9.2. détermination de l'acidité titrable.....	16
9.2.1. principe.....	16
9.2.2. Mode d'opérateur.....	16
9.3. Détermination de la densité.....	17
9.3.1. Principe.....	17
9.3.2. Mode d'opérateur.....	17
10. Etude de la cinétique de croissance des souches lactique.....	17
10.1. Préparation de la pré-culture.....	17
10.2. Inoculation du lait.....	17
10.3. Technique de micro-spot.....	18
11. Fabrication du fromage.....	18
11.1. Emprésurage.....	18
11.2. Coagulation.....	19
11.2.1. Coagulation mixte.....	19
11.3. Tranchage.....	19
11.4. Brassage.....	20
11.5. Egouttage.....	20
11.6. Salage.....	20
11.7. Moulage.....	21
11.8. Conservation.....	21
11.9. Les analyses physico-chimiques et organoleptiques du fromage.....	22
11.9.1. Analyse physico-chimique.....	22
11.9.1.1. Mesure de pH.....	22
11.9.1.2. Mesure de l'acidité dornic.....	22
11.9.1.3. Détermination du rendement en fromage.....	22
11.9.2. Analyse organoleptique.....	22
11.9.3. Elaboration d'une fiche de dégustation.....	23

## RESULTATS ET DISCUSSION

1. la pré-identification des souches.....	25
1.1. Etude morphologique.....	25
1.1.1. Caractère macroscopique.....	25
1.1.1.1. Sur milieu solide.....	25
1.1.1.2. Sur milieu liquide.....	26
1.1.2. Caractère microscopique.....	26
1.1.2.1. Coloration de gram.....	26
1.2. Etude biochimique.....	27
1.2.1. Test de catalase.....	27
1.2.2. Type fermentaire.....	27
2. Caractérisation de l'enzyme utilisée.....	28
2.1. Temps de floculation.....	28
2.2. Activité coagulante.....	28
2.3. Force coagulante.....	28
3. Analyse physico-chimique du lait.....	28
3.1. pH et l'acidité dornic du lait.....	28
3.2. La densité.....	29
4. Cinétique de croissance.....	29

4.1.pH.....	29
4.2.détermination de l'acidité dornic.....	30
4.3.dénombrement des colonies.....	31
5. Analyse physico-chimique du fromage.....	32
5.1.Mesure du pH et l'acidité.....	32
5.2.Calcul de rendement.....	32
6. Analyse organoleptique du fromage.....	32

**Conclusion**

**Références bibliographique**

**Annexes**

### **Introduction**

La dénomination « fromage » est réservée à un produit fermenté ou non, obtenu par coagulation du lait suivie d'égouttage, il résulte de la coagulation à prédominance lactique du lait (due aux ferments), combiné souvent à l'action de l'enzyme. Le fromage frais est prêt à la consommation peu de temps après sa fabrication (**Pernoud *et al*, 2005**).

Les bactéries lactiques représentent un groupe hétérogène de micro-organismes produisant de l'acide lactique comme produit principal, elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, elles font partie de la flore intestinale humaine et animale. Ces bactéries sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter leur durée de conservation (**Zarour *et al*, 2013**).

Pour compenser les problèmes liées à l'instabilité des enzymes au cours de l'utilisation, l'enzyme peut être immobilisée artificiellement sur des supports solubles ou insolubles, ces catalyseurs offrent la possibilité d'une utilisation répétées dans des domaines très variés (**Benslama, 2016**).

Nous nous sommes concentrés sur l'immobilisation des enzymes « la chymosine » sur un support inorganique « l'argile » ; car les argiles sont utilisées comme additifs technologiques dans les aliments complets pour animaux, elles sont également recommandées pour leurs propriétés pro-digestives.

C'est dans ce cadre que nous avons pensé à étudier l'essai de fabrication d'un fromage frais par coagulation mixte (bactéries lactique et l'enzyme immobilisée).

Les objectifs de notre étude peuvent se résumer en deux points essentiels :

- L'obtention d'un fromage frais par coagulation mixte (bactéries lactiques et enzyme immobilisée sur un support d'argile).
- Evaluation de l'effet combinée de l'enzyme immobilisée (chymosine) et les ferments lactiques (*Lactococcus diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides*).



**1. Objectifs :** Les objectifs de notre étude peuvent se résumer en deux points essentiels :

- Obtention du fromage frais par coagulation mixte (bactéries lactiques libres et enzyme immobilisée sur un support d'argile).
- Evaluation de l'effet combiné de l'enzyme immobilisée (chymosine) et les ferments lactiques (*Leuconostoc mesenteroides* et *Lactococcus diacetylactis*) sur les qualités organoleptiques et le rendement en fromage.

## **2. Lieux et durée de travail**

Notre étude a été menée entre le 19/02/2017 et le 31/05/2017 au niveau des laboratoires de microbiologie ; technologie alimentaire ; biochimie ; physiologie végétale de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université IBN KHALDOUN de Tiaret.

## **3. Matériels et méthodes**

### **3.1. Matériels et milieux de culture utilisés**

Les appareillages, verreries et les milieux utilisés dans notre expérimentation sont présentés dans le **tableau 01**.

**Tableau 01: Matériels utilisés**

Appareillages et petit matériel	Verreries	Autres matériels utilisés	Produits et milieux de culture utilisés
Agitateur magnétique (IKA)	Béchers	Bec bunsen	Alcool
Autoclave	Boîtes de pétri	Anse de platine	Agar
Balance (KERN)	Lames	Tamis de 40µm	Eau distillée
Etuve (MEMMERT)	Tubes à essai	Barreaux	Eau oxygénée
Microscope optique	Éprouvettes	Barreaux magnétiques	Fuchsine
Réfrigérateur (IRIS)	Flacons	Pinces	Lugol
Pompe à vide	Cloches de	Portoirs	Violet de gentiane
Vortex (vortex mixer. LAB LINE)	Durham	Spatules	Huile d'immersion
pH-mètre (HANA-INSTRUMENT)	Cuves	Seringues	Bouillon M17 (annexe 01)
Bain marie(MEMMERT)	Cristallisoirs		Bouillon MRS (annexe 01)
Centrifugeuse (HETTICH-UNIVERSAL)	Erlenmeyers		Gélose MRS (annexe 01)
Thermomètre	Entonnoirs		Poudre de lait (Célia)
Spectrophotomètre UV-VIS-1202 (SHIMADZU)			Lait écrémé en provenance de Giplait-Tiaret
Thermolactodensimètre			Solution de soude N/9
Plaque chauffante			Sel de table chems
Micropipette			Phénolphtaléine

### 3.1.1. Matériels biologiques

Les bactéries lactiques (*Leuconostoc mesenteroides* et *Lactococcus diacetylactis*) utilisées dans cette étude proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée de l'Université d'Oran.

L'enzyme utilisée (chymosine) est une enzyme commerciale présentée sous forme de poudre ; elle nous a été offerte par l'unité Giplait-Tiaret, elle a été conservée à 4°C. Nous avons préparé une solution enzymatique mère de 70g/l. Cette concentration a été estimée et calculée à partir des travaux antérieurs (**Boudjra et al, 2016**).

L'argile utilisée dans cette étude est la bentonite de Maghnia, qui a été mise à notre disposition par l'entreprise ENF de Tiaret.

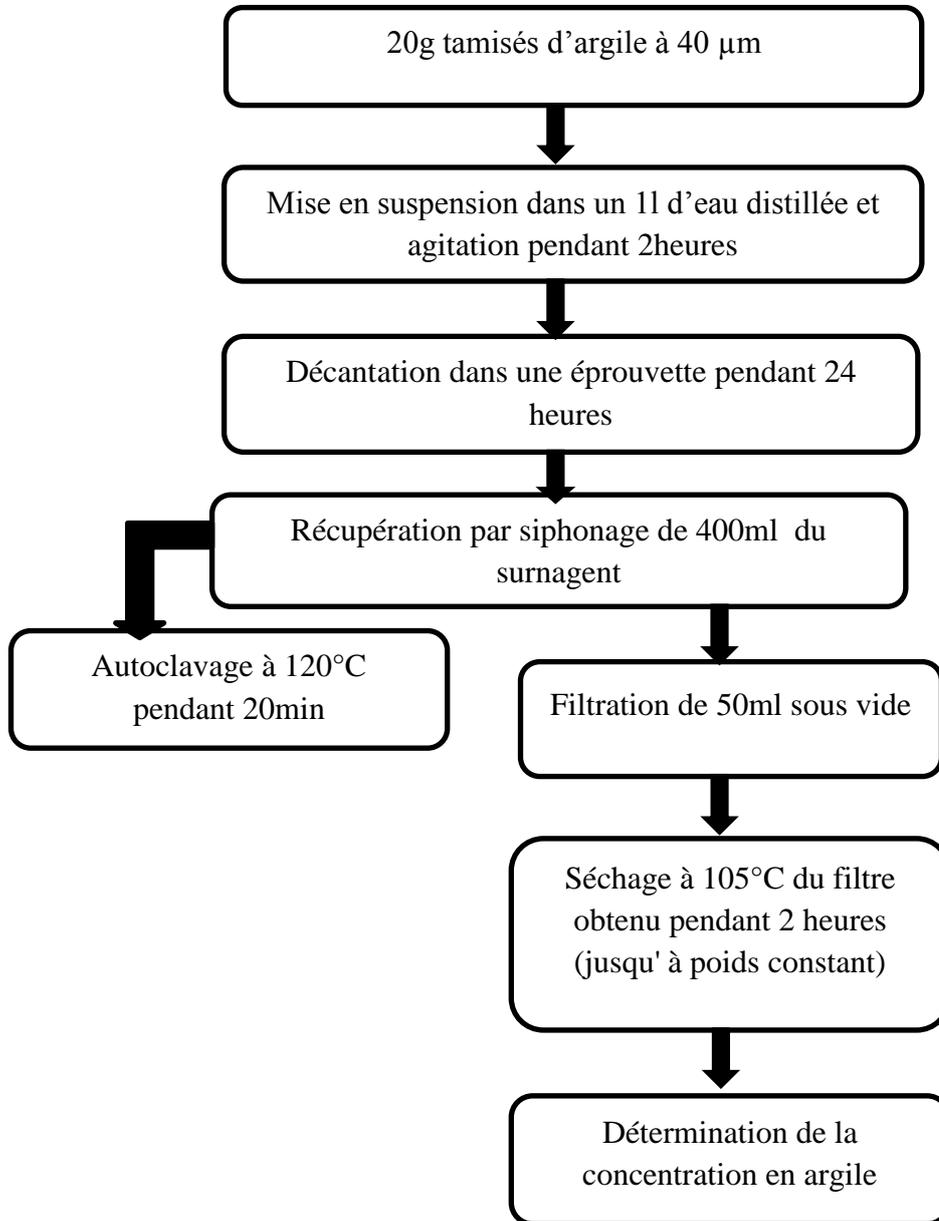
### 3.2. Méthodes

Le protocole expérimental global est représenté dans les **figures 01,02, 03 et 04** :

- la purification de l'argile est représentée dans la **figure 01**.
- la pré-identification des souches lactiques (*Lactococcus diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides*) est présentée dans la **figure 02**.
- l'immobilisation de l'enzyme est présentée dans la **figure 03**.
- La préparation du lait est présentée dans la **figure 04**.

#### 4. Purification de l'argile

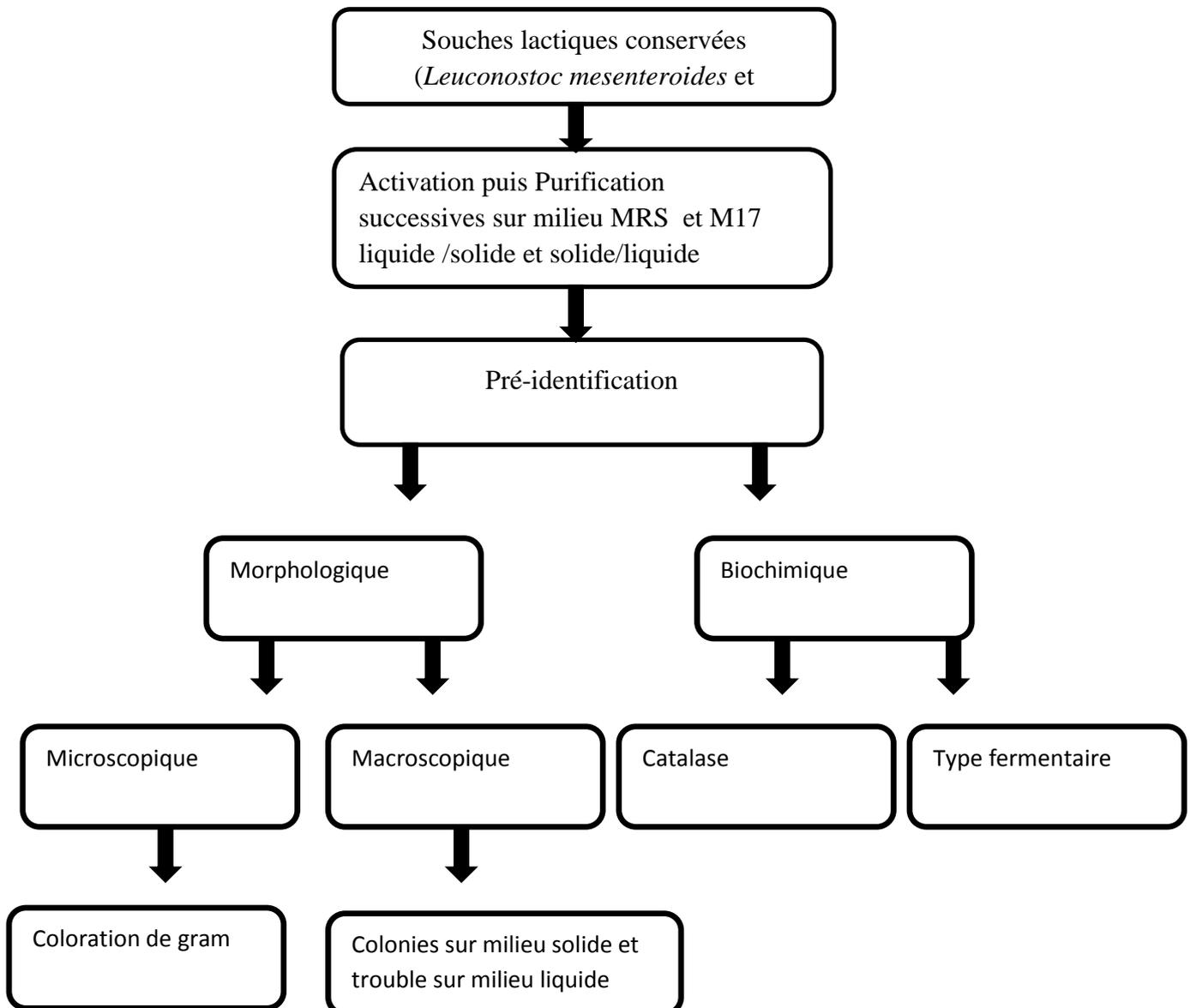
Le protocole suivi lors de cette étude est décrit dans la **figure 01**.



**Figure 01** : La purification de l'argile.

## 5. La pré-identification des souches lactiques

La pré-identification des souches est représentée dans la **figure 02**.



**Figure 0 2** : Pré-identification des souches lactiques.

## 5.1. Les bactéries lactiques utilisées

Les souches lactiques utilisées (19D et SD17) ont été conservées dans un mélange de glycérol, lait écrémé additionné d'extrait de levures et mis dans des eppendorfs à -20°C.

### 5.1.1. *Lactococcus diacetylactis*

Le genre *Lactococcus* est un groupe de bactéries coccoïdes, qui sont regroupés en paires ou en courtes chainettes, immobiles, Gram positive, obligatoirement des homofermentaires, anaérobies facultatifs, à une température optimale de croissance de 30°C (**Robert et Hutins, 2006**).

De nombreuses bactéries lactiques en particulier *Lactococcus diacetylactis*, utilisent le citrate pour produire des composés d'arôme tels que l'acétoïne et le diacétyl. Ce dernier est le composé aromatique le plus recherché dans les fromages frais (**Bassit et al, 1993**).

### 5.1.2. *Leuconostoc mesenteroides*

Le genre *Leuconostoc* a été défini par Van Thieghem en 1878. Le terme *Leuconostoc* vient du mot nostoc qui est une algue bleu mucilagineuse et de leuco qui veut dire blanc (**Abbes et al, 2010**). Les *Leuconostocs* sont des cocci sphériques ou ovoïdes en paire ou en tétrade ayant principalement les caractéristiques suivantes (**Bourgois et al, 1996**):

Immobiles, Gram positive, hétérofermentaire (production d'acide lactique et d'autres acides), catalase négative.

## 5.2. Activation et Purification

Cette technique consiste à effectuer des repiquages sur bouillon M17 pour *Lactococcus diacetylactis* et MRS *Leuconostoc mesenteroides* liquides. Après croissance, on procède à la purification sur milieu solide. Après incubation à 30°C/24h, les colonies présentent des aspects morphologiquement différents.

## 5.3. Pré-identification

La pureté des souches est confirmée par des observations microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram (**Moulay, 2014**), et par des observations macroscopiques (aspect des colonies).

## 5.4. Tests morphologiques

### 5.4.1. Aspect microscopique

Au cours des analyses microbiologiques ; le technicien peut être amené à observer des bactéries ; le plus souvent, à l'aide d'un microscope optique (**Camille, 2007**).

#### 5.4.1.1. Coloration de gram

La coloration de Gram permet de déceler chez les bactéries une différence de composition chimique qui coïncide avec des différences de comportement physiologique absolument fondamentales.

L'observation en microscope permet de définir l'aspect morphologique des isolats, retenues leur taille et leur mode de regroupement (**Badis et al, 2004**).

Elle permet en général d'apprécier la pureté des souches bactérienne avant toute identification (**Camille, 2007**).

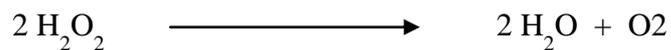
#### 5.4.2. Aspect Macroscopique

L'examen macroscopique permet de décrire les cultures bactériennes sur milieu solide. On relève la couleur, le pourtour, l'élévation, l'aspect, la pigmentation, l'opacité et le diamètre des colonies (**Badis et al, 2004**).

#### 5.5. Tests biochimiques

##### 5.5.1. Catalase

Selon **Moulay(2005)**, la recherche de catalase se fait par la mise en contact des colonies bactériennes avec une goutte d'eau oxygénée. Le dégagement de gaz se traduit par l'activité positive de l'enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène.



*Lactococcus diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* sont des souches à gram positive et catalase négative (**Zarour et al, 2013**).

##### 5.5.2. Type fermentaire

Le bouillon MRS contenant la cloche du Durham a été utilisé pour mettre en évidence la production de CO<sub>2</sub> par l'incubation des cultures jeunes de 18h à 30°C pendant 24 à 48h. Ce test va nous permettre de savoir le type fermentaire de nos souches (hétérofermentaire (bulles d'air dans la cloche) ou homofermentaire) (**Bellil, 2013**).

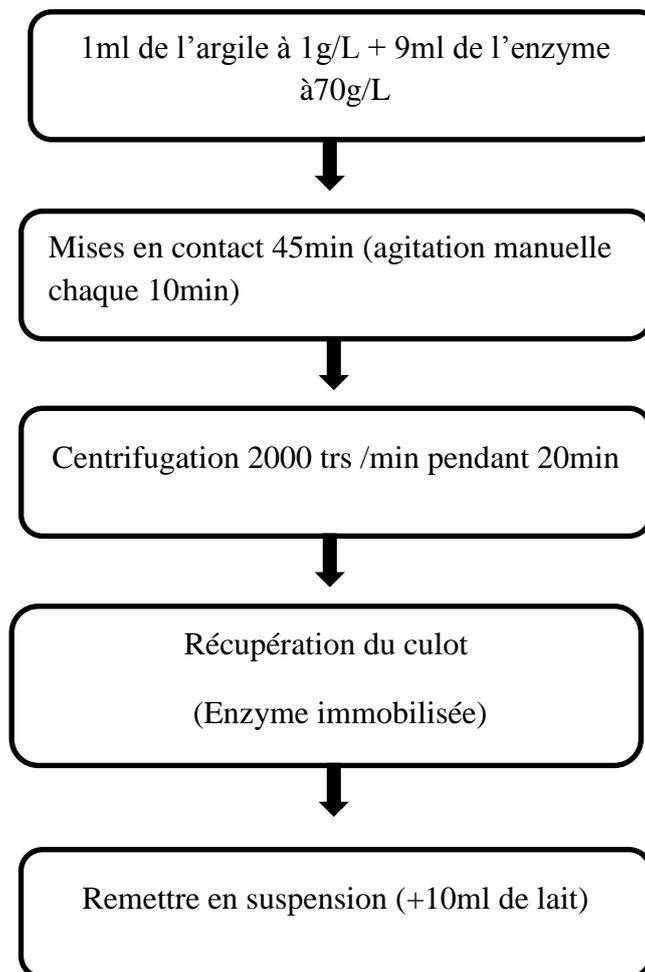
#### 5.6. Conservation des souches

##### 5.6.1. Conservation des souches à court terme

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

## 6. Immobilisation de l'enzyme

Le protocole d'immobilisation de l'enzyme est présenté dans la **figure 03**.



**Figure 03** : Les étapes d'immobilisation de l'enzyme.

## 6.2. Détermination des caractéristiques de la coagulation enzymatique

### 6.2.1. Temps de floculation

Selon **Eck (1997)**, le temps de floculation est le temps de l'apparition des premiers flocons visibles à l'œil nu après le contact entre le substrat et la solution enzymatique.

#### 6.2.1.1. Mode opératoire

- mettre 10ml de lait dans un tube à essai puis chauffer à 30°C
- au temps  $t_0$ , 1ml d'enzyme (chymosine) est ajouté au lait chauffé et porté dans un bain marie à 30°C (le chronomètre déclenché).
- On arrête le chronomètre lorsqu'on observe l'apparition des 1<sup>ers</sup> flocons ce qui nous permet d'avoir la valeur du temps de floculation.

### 6.2.2. Activité coagulante

Le pouvoir coagulant des protéases est déterminé par la mesure de l'activité coagulante. Cette activité s'exprime par la rapidité avec laquelle l'enzyme employée coagule le lait (**Alalouche, 2007**).

L'unité d'activité coagulante (U.A.C) ou l'unité présure (UP) est définie par la quantité d'enzyme contenue dans 1ml de la solution enzymatique qui peut coaguler 10ml de lait (**Alais, 1974 ; Ramet, 1997**).

$$UP=10.V/t.V'$$

**UP** : Unité présure.

**V** : Volume de lait (10 mL).

**V'** : Volume de l'extrait enzymatique (1 mL).

**t** : Temps de floculation (seconde).

L'unité d'activité coagulante représente la quantité d'enzyme (chymosine) contenue dans un 1 mL de la solution enzymatique, qui peut coaguler 10 mL de lait.

### 6.2.3. La force coagulante

L'activité coagulante peut être également exprimée en force coagulante (**Tsouli, 1979 ; Nouani et al, 2009**). Cette force coagulante définit le volume de lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique ou d'une enzyme.

La force coagulante est exprimée par la formule suivante :

$$F=2400.V/t.V'$$

**F** : Force de l'enzyme.

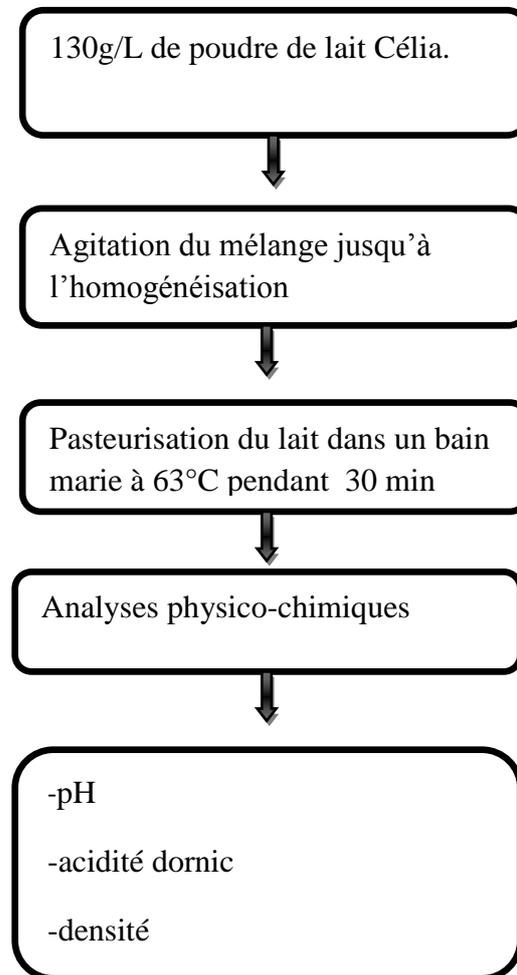
**V** : Volume du lait ajusté.

**V'** : Volume de la solution enzymatique.

**t** : Temps de coagulation du lait (seconde).

## 7. Préparation du lait

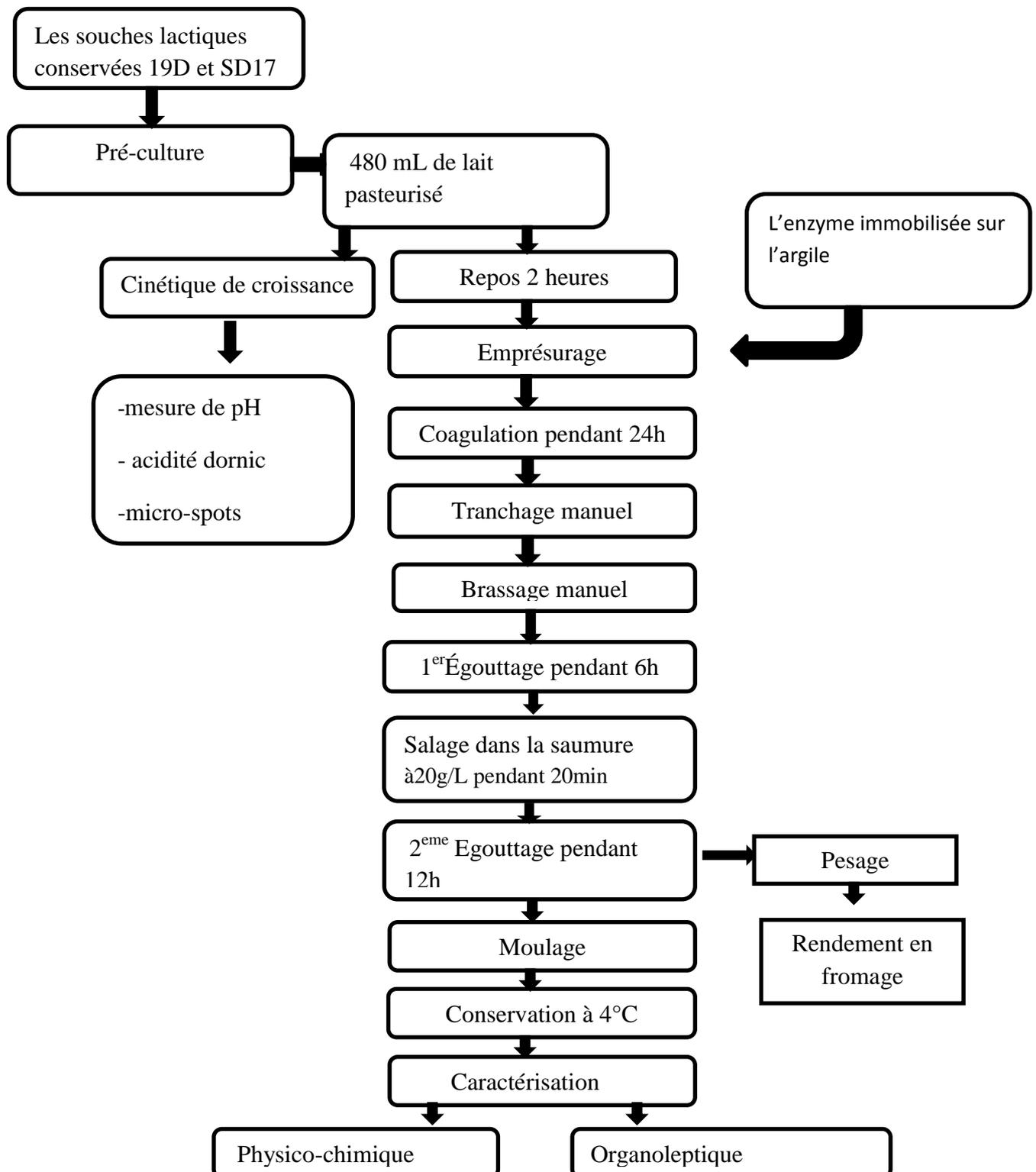
Le protocole suivi lors de cette étude est décrit dans la **figure 04**.



**Figure 04** : La préparation du lait.

## 8. Protocole expérimental

Le protocole suivi lors de cette étude est décrit dans la **figure 05**.



**Figure 05** : Protocole expérimental global.

## 9. Analyses physico-chimiques du lait

Pour étudier la qualité du lait utilisé dans la fabrication du fromage, plusieurs tests physico-chimiques ont été réalisés.

### 9.1. Mesure de pH

#### 9.1.1. Principe

La mesure du pH s'effectue à une température du lait à 30C° par un pH-mètre de type HANNA.

#### 9.1.2. Mode d'opérateur

D'après **Debouz *et al*, (2014)**, la mesure du pH passe par les étapes suivantes :

- Etalonnage de l'appareil.
- L'électrode du pH-mètre est ensuite rincée à l'eau distillée.
- Un volume de 10ml du lait est mis dans un bécher.
- Le bout de l'électrode du pH-mètre est immergé dans le lait.
- La valeur du pH s'affiche instantanément sur l'écran.

### 9.2. Détermination de l'acidité titrable

#### 9.2.1. Principe

L'acidité titrable est déterminée par la méthode dornic à l'aide d'une solution de soude à N/9 (0.111 mol/l) et de phénolphtaléine en solution alcoolique à 2 % employée comme indicateur (**Seme *et al*, 2015**).

#### 9.2.2. Mode opératoire

Selon **Rhiat *et al*, (2011)** et **Ouazzani *et al*, (2014)**, les étapes de cette analyse se résument comme suit :

- Un volume de 10 mL de lait est prélevé à l'aide d'une pipette et versé dans un bécher.
- On ajoute deux gouttes de phénol phtaléine à 1%.
- Puis on titre l'acidité en ajoutant la solution de la soude à N/9 goutte à goutte à l'aide d'une burette de Mohr à robinet jusqu'à l'obtention d'une coloration rose persistante.

Selon **Ouazzani *et al*, (2014)**, les résultats sont exprimés en degré dornic ou en pourcentage de l'acide lactique, où 1 degré dornic (D°) correspond à 0.1 g d'acide lactique par litre de lait.

$$\text{L'acidité en } ^\circ\text{D} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

**V** : est le volume en mL de solution de soude versé dans le titrage

### 9.3. Détermination de la densité

#### 9.3.1. Principe

La densité est mesurée à l'aide d'un thermolactodensimètre.

#### 9.3.2. Mode opératoire

Selon **Debouz *et al*, (2014)**, la mesure de densité se fait comme suit :

- Plonger le densitomètre dans une éprouvette de 100 mL rempli de lait à analyser.
- Lorsqu'il se stabilise, la lecture de la densité se fait directement sur l'appareil à 15°C ; faire des corrections si la température est supérieure ou inférieure à 15°C.

### 10. Etude de la Cinétique de croissance des souches lactiques

L'acidification du lait est due essentiellement à la production d'acide lactique qui est plus ou moins importante selon la souche lactique. Ce caractère est très recherché en industrie laitière, il dépend de l'aptitude de la souche à fermenter le lactose et à résister à l'acidité du milieu (**Guiraud, 1998**).

#### 10.1. Standardisation

Pour le standard 5 Mc farland, l'absorbance d'une suspension bactérienne, à la longueur d'onde de 625nm doit être comprise entre 0,08 à 0.1. Cette densité est l'équivalent d'une suspension d'environ  $10^7$  à  $10^8$  cellules /ml (**Wiegand *et al*, 2008**).

Pour chacune des souches :

- Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile des colonies à partir d'une culture de 24h.
- Transvaser dans un tube contenant un volume d'eau distillée stérile.
- Ajuster la densité de ces tubes « inoculum » à celle de 0,5 Mc farland à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 625nm. (si la charge est élevée en ajoute de l'eau distillée stérile par contre si elle est moindre en ajoute des colonies).

#### 10.2. Préparation de la pré-culture

Dans deux tubes contenant 09mL de lait écrémé stérile, on inocule les souches:

-Dans le premier tube on inocule *Lactococcus diacetylactis*.

-Dans le deuxième tube on inocule *Leuconostoc mesenteroides*.

Les deux tubes représentent les starters de fermentation (**Moulay, 2005**).

-incuber à 30°C pendant 24h.

#### 10.3. Etude de croissance bactérienne.

-Après 24h d'incubation, un cristalliseur stérile rempli par 480mL de lait pasteurisé estensemencé par les deux tubes de pré-cultures préparées, le tout est bien mélangé.

- le mélange est réparti en 06 tubes à essai et incubés à 30°C.
- les échantillons sont prélevés de façon aseptique pour déterminer le pH, l'acidité dornic et le dénombrement des colonies.
- un échantillon est recueilli dès le début à T<sub>0</sub>, puis après 1h, 2h, 3h, 4h et 5h.
  - Le pH et l'acidité dornic sont mesurés de la même façon que pour le lait.

#### 10.4. Dénombrement des colonies

Selon **Bulard (2012)**, la croissance bactérienne est établie par le dénombrement des colonies sur milieu solide (MRS) par la technique de micro-spots qui permet d'évaluer les bactéries viables d'une suspension par comptage des unités formant des colonies (UFC).

Le dénombrement est réalisé comme suit :

- Pour chaque tube à essai, des dilutions allant de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-5</sup> ont été préparées à partir de la solution mère.
- 10 µL de suspension de chaque dilution sontensemencés dans des boites de pétri contenant la gélose MRS solidifiée par la méthode des spots.
- Laisse sécher les gouttes à la surface de la gélose.
- Incuber à 30°C pendant 24 h.
- Les spots contenant 3 à 60 colonies sont retenus.

Les résultats sont exprimés selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V (n1+0,1n2) d}$$

**N** : le nombre d'unité format colonie (Ufc/µL).

- $\sum C$  : la somme des colonies comptées sur les boites.
- **V** : le volume d'inoculum en µl appliqué à boites.
- **n1** : le nombre des spots comptés à la dilution la plus faible.
- **n2** : le nombre de spots retenus à la dilution la plus élevée.
- **d** : la valeur correspondant à la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements ont été retenus.

## 11. Fabrication du fromage

La fabrication des fromages est plus ou moins complexe. Ils subissent des opérations diverses en fonction du type de fromage souhaité :

### 11.1. Maturation

Les ferments lactiques sont ajoutés au lait pour provoquer sa coagulation.

### 11.2. Emprésurage

D'après **Hamama et al, (1995)**, l'emprésurage se fait par l'ajout de la suspension contenant de l'enzyme immobilisée au u lait déjàensemencé par les ferments lactiques (480 mL lait+ 20 mL pré-culture).



**Photo 01** : l'ajout de l'enzyme immobilisée.

### 11.3. Coagulation

#### 11.3.1. Coagulation mixte

Un grand nombre de fromages est obtenu par coagulation mixte (**André et Jean-Claude, 1997**). Elle résulte de l'action conjuguée de la chymosine et l'acidification (**Romain et al, 2008**).



**Photo 02** : coagulation mixte du lait.

#### 11.4. Tranchage

Il consiste à couper le gel en portion.



**Photo 03** : tranchage du fromage.

#### 11.5. Brassage

Il consiste à agiter modérément dans lactosérum les grains de caillé obtenus après tranchage.



**Photo 04** : brassage de fromage.

#### 11.6. Egouttage

Se traduit par une élimination progressive de lactosérum qui s'accompagne d'une réaction et d'un durcissement corrélatif du gel: il conduit à l'obtention d'une masse de caillé (**André et Jean-Claude, 1997**).



**Photo 05** : égouttage de fromage.

### 11.7. Salage

Selon **Juliet (2014)**, Le fromage est frotté ou saupoudré de sel, ou bien encore plongé dans de la saumure avant d'être placé dans une chambre froide. Dans notre étude, le caillé récupéré après égouttage est mis dans une solution salée 20g/L pendant 20 min.



**Photo 06** : salage du fromage.

### 11.8. Moulage

D'après **Juliet (2014)**, le caillé est alors placé dans des moules ou des cercles et parfois pressé avant d'être ressorti.



**Photo 07**: moulage du fromage.

### 11.9. Conservation

La conservation du produit fini se fait à une température de 4°C pendant 48h .



**Photo 08:** la conservation du fromage.

## 11.10. Analyses physico-chimiques et organoleptiques du fromage

### 11.10.1. Analyses physico-chimiques

Les analyses physico- chimiques effectuées sur le produit fini « fromage » comportent :

- La mesure de pH.
- Mesure de L'acidité Dornic.
- Détermination du rendement en fromage.

#### 11.10.1.1. Mesure de pH

10g du fromage sont dilués dans 70mL d'eau distillée, le pH est déterminé par l'immersion de l'électrode du pH-mètre dans le mélange (**Quasem *et al*, 2009**).

#### 11.10.1.2. Mesure de l'acidité Dornic

Selon **Mathieu (1998)** une solution basique de soude (1/9 N) est ajoutée par titration à 10ml de solution de fromage préparé (4g de fromage préparé dilué dans 40mL de l'eau distillée), additionné de 3 gouttes de phénophtaléine indicateur coloré qui passe de l'incolore en milieu acide au rose en milieu alcalin. On note le volume de soude utilisée dans le titrage.

L'acidité s'exprime en degré Dornic (°D) suivant la formule décrite précédemment pour le lait.

#### 11.10.1.3. Détermination du rendement en fromage

Le rendement fromager ou le rendement de la transformation du lait en fromage est l'expression mathématique de la quantité de fromage obtenue à partir d'une quantité donnée de lait (**Eck et Gillis, 1997**).

Dès la séparation de deux phases du lait (lactosérum et caillé), on verse le mélange sur un tissu filtrant pour faciliter l'égouttage. Le poids du lait et de caillé sont notés pour servir au calcul de rendement selon l'équation suivante (**Vandeweghe, 1997**):

$$\mathbf{Rf = \text{Quantité de caillé frais} / \text{Quantité de lait} \times 100}$$

### 11.10.2. Analyses organoleptiques

Les caractéristiques sensorielles d'un aliment sont des critères importants de l'acceptabilité de l'aliment par le consommateur. L'aspect d'un fromage, sa couleur, son odeur, sa consistance, sa saveur, son goût provoquent des réactions plus ou moins vives d'acceptation ou de rejet (**Eck et Gillis, 1997**).

L'objectif de l'analyse consiste à présenter à un sujet un échantillon de fromage frais pour lequel il doit faire une évaluation par des observations visuelles et par dégustation du fromage. Les caractérisations portent sur l'aspect (hydrant, sec,...), la texture (ferme, souple...), l'odeur (lait, fromage...), goût (acide, amère...) selon la fiche de dégustation.

### 11.10.3. Elaboration d'une fiche de dégustation

La fiche de dégustation est élaborée sous forme d'un tableau regroupant des propriétés sensorielles du fromage. Elle permet aux dégustateurs de donner des valeurs aux différentes grandeurs sensorielles étudiées. La fiche de dégustation est représentée par le **tableau 02**.

**Tableau 02** : caractères sensoriel.

<b>Caractère étudié</b>		<b>Fromage</b>
<b>Couleur</b>	Jaunâtre	
	Jaune crème	
	Crème claire	
	Blanchâtre	
<b>Aspect</b>	Sec	
	Hydratant	
	Normal	
<b>Texture</b>	Ferme	
	Granulée	
	Souple	
	Onctueuse	
<b>Gout</b>	Très bon	
	Bon	
	Moyen	
	Acide	
	Amère	
	Rance	
	Sale	
<b>Odeur</b>	Lait cru	
	Beurre	
	Fromage	
	L'ben	
<b>Le fromage est : (appréciation)</b>		

## 1. Pré-identification des souches

### 1.1. Etude morphologique

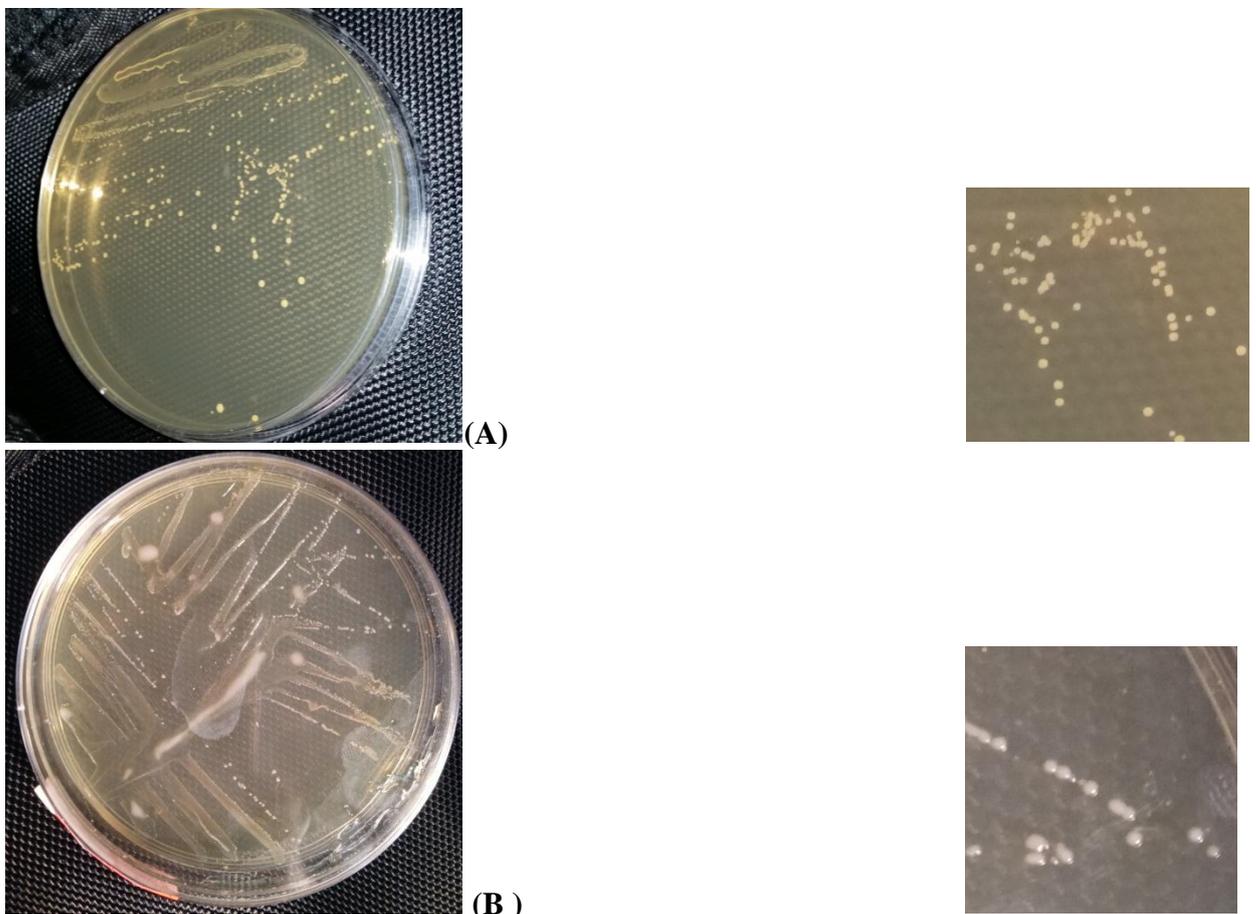
L'étude morphologique englobe les caractéristiques macroscopiques et microscopiques servant de base à l'identification des genres.

#### 1.1.1. Caractères macroscopiques

##### 1.1.1.1 Sur milieu solide

L'examen macroscopique de la souche *Leuconostoc mesenteroides* (19D) et la souche *Lactococcus diacetyllactis* (SD17), montre des colonies circulaires de petite taille d'environ 1 mm de diamètre ; blanchâtre ou légèrement jaunâtre; à pourtour régulier et lisse.

Nos observations concordent avec celles faites par **Zarour et al, (2012)**.

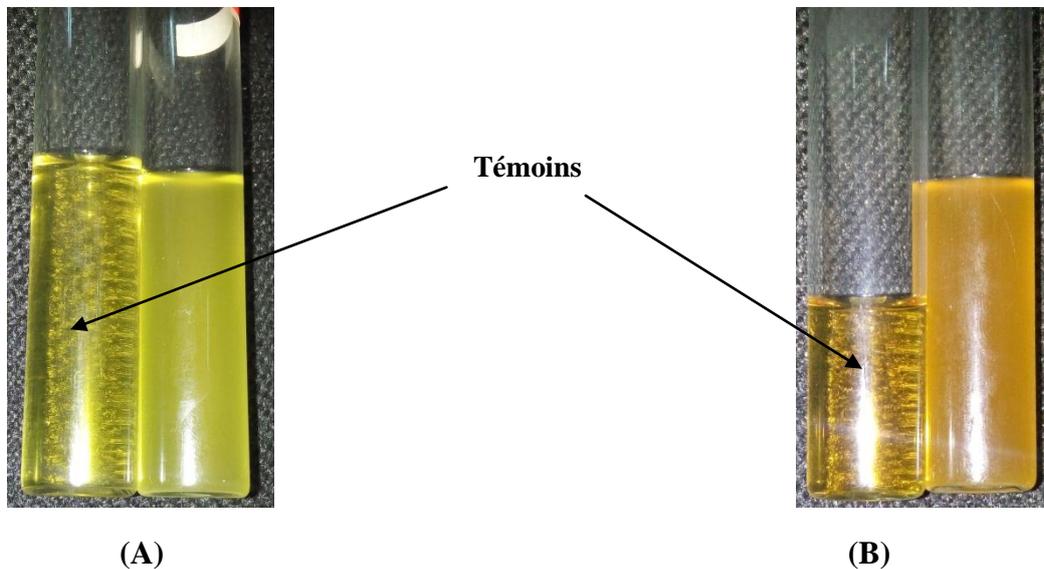


**Photo 09:** aspect macroscopique des souches lactiques cultivées sur milieu

Solide et incubées à 30°C/24h. (A) 19D et (B) SD17.

### 1.1.1.2. Milieu liquide

La croissance des souches lactiques apparait sous forme de trouble dans le milieu MRS et M17 liquides.



**Photo 10 :** Aspect macroscopique des souches lactiques cultivées sur milieu Liquide incubées à 30°C/24h. (A)SD17 et (B) 19D.

### 1.1.2. Caractères microscopiques

#### 1.1.2.1 Coloration de gram

L'observation microscopique après coloration de gram a montré que *Lactococcus* et *Leuconostoc* sont des grams positifs, se présentant en forme de cocci isolées ou disposées en courte chaînette. Nos observations sont conformes à celle faites par **Badis et al, (2005)**.



**Photo11:** Observation microscopique des souches ;(A) 19D et (B) SD17 après coloration de gram ( $G \times 100$ ).

## 1.2. Etude biochimiques

### 1.2.1. Test de catalase

Selon **Camille (2007)**, Le dégagement de bulles de gaz indique catalase +, ce qui signifie que la souche produit la catalase.

Dans notre travail, nous avons constaté l'absence totale de dégagement de bulles de gaz ce qui signifie que nos souches sont catalase négative (catalase -). Selon **Badis et al, (2005)**, les bactéries lactiques sont à catalase négative.

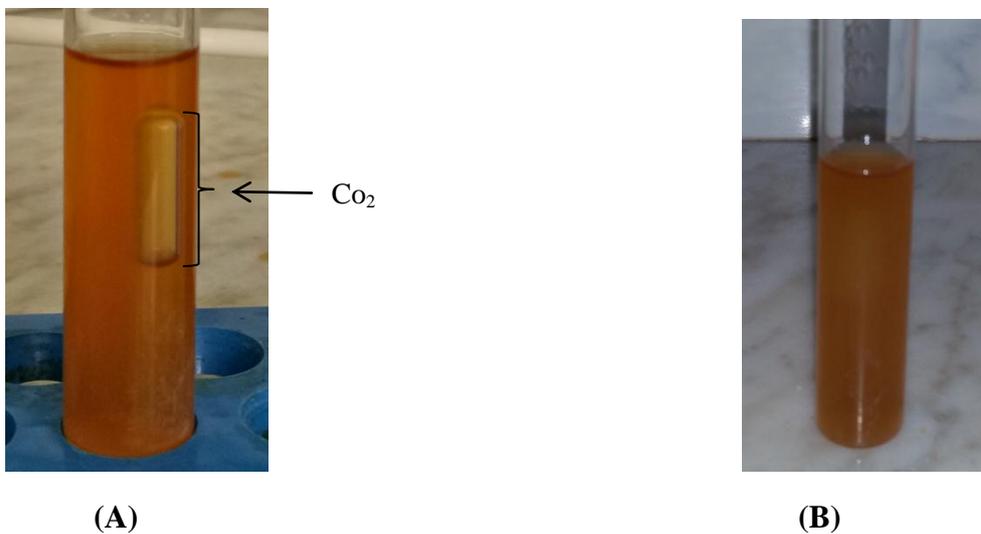
L'absence des bulles de gaz



**Photo 12** : test de catalase (catalase-).

### 1.2.2. Type fermentaire

Pour *Leuconostoc*, il y a eu dégagement gazeux ( $\text{CO}_2$ ) dans la cloche du durham. Donc *Leuconostoc* est hétérofermentaire, par contre *Lactococcus*, il y'a eu absence de dégagement gazeux dans la cloche de durham. Donc *Lactococcus* est homofermentaire. Nos résultats sont conformes à ceux trouvés par **Naouale (2008)**.



**Photo 13:** type fermentaires des souches *Ln. mesenteroides* et *Lc. diacetylactis*

Dans du bouillon MRS contenant la cloche du durham incubées à 30°C/24h.  
(A) 19D et (B) SD17.

## 2. Caractérisation de l'enzyme utilisée

Les caractéristiques de la chymosine (libre ou fixée sur l'argile) sont regroupées dans le **tableau 03**.

**Tableau 03** : Caractérisation de la chymosine libre et fixée.

	Temps de floculation (min) (30°C)	Activité coagulante UAC/mL	Force coagulante	Temps de coagulation (min)(30°C)
Chymosine libre	6	0.27	1/17,39	23
Chymosine fixée	4	0.41	1/21,05	19

### 2.1. Temps de floculation

Le temps de floculation est d'environ 6 min pour la chymosine libre et 4min pour la chymosine fixée. Nos résultats sont identiques à ceux trouvés par **Alaise et al, (1972)**.

### 2.2. Activité coagulante

L'activité coagulante est de 0.27 unité/mL pour la chymosine libre et 0.41 unité/mL pour la chymosine fixée, ces résultats sont inférieurs à celui trouvé par **Boughellout, (2007)**, qui est de 2,42 unité/mL.

Donc l'unité d'activité coagulante est liée au temps de floculation si ce dernier est élevé, l'unité d'activité coagulante est faible.

### 2.3. Force de coagulation

La force coagulante de la chymosine libre est de 17,39 et 21,05 pour la chymosine fixée, ce résultat est différent de celui obtenu par **Nouani et al, (2009)** évalué à 1 /3200.

## 3. Analyses physico-chimiques du lait

Ces analyses ont concerné la mesure du pH, la détermination de l'acidité dornic et la densité de lait.

Les résultats trouvés sont regroupés dans le **tableau 04**.

**Tableau 04** : Résultats d'analyses physico-chimiques du lait.

	L'acidité °D	Ph	Densité
Analyse du Lait	24	6.3	1.030

### 3.1. pH et l'acidité dornic du lait

Le résultat des analyses de pH de lait est de 6.3 et La valeur de l'acidité dornic est de 24 °D.

La valeur de pH trouvé est inférieure à la valeur citée par **Hamama et al, (1995)** qui est 6.5 par contre l'acidité dornic est supérieure à la valeur citée par **Hamama et al, (1995)** qui est de l'ordre de 17.6°D.

Le pH du lait est légèrement acide alors que la valeur moyenne de l'acidité est légèrement élevée par rapport à l'acidité du lait frais.

L'acidité et le pH dépendent de la teneur en caséine, en sels minéraux et en ions (**Molay, 2005**).

D'après **Mathieu, (1998)**, le pH varie avec la richesse du lait en phosphate, citrate, et caséines.

L'acidité est définie comme le titre du lait, elle permet de mesurer la teneur totale du lait en acide lactique (**Ltd, 1986**).

### 3.2. Densité

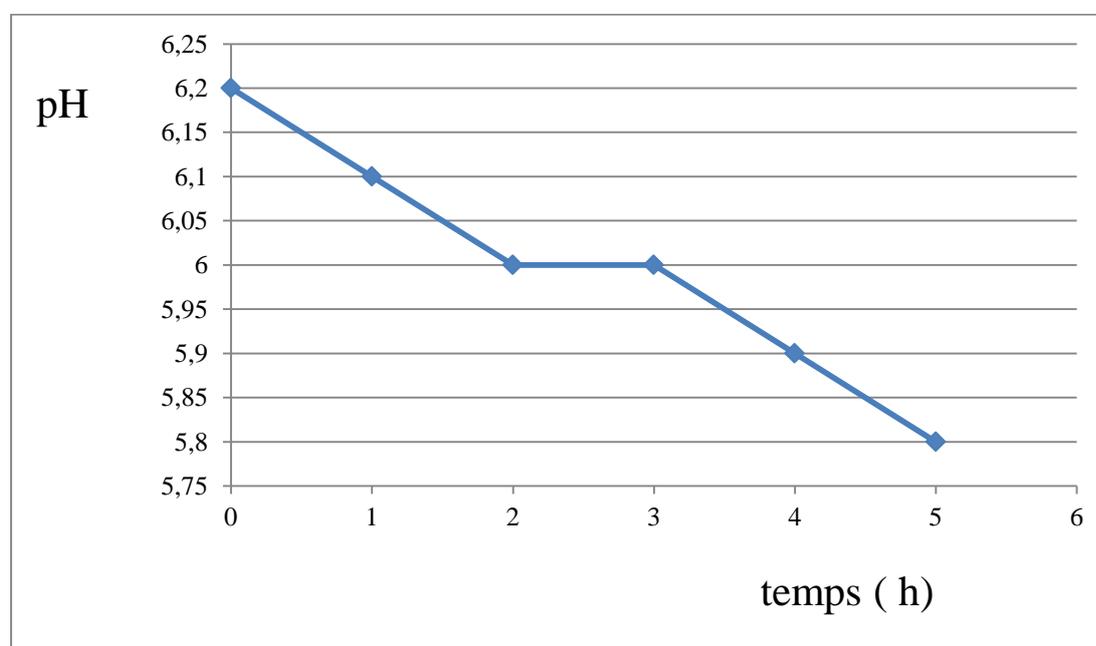
La valeur de la densité de notre travail (1032) est identique à la valeur trouvée par **Ouazzani Taybi et al (2014)**.

D'après **Ouazzani Taybi et al, (2014)**, La densité dépend de la teneur en matière sèche, en matière grasse et l'augmentation de la température.

## 4. Cinétique de croissance

### 4.1. pH

L'évolution de la variation du pH des souches *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactococcus diacetylactis* dans le lait est représentée par la **figure 06**.

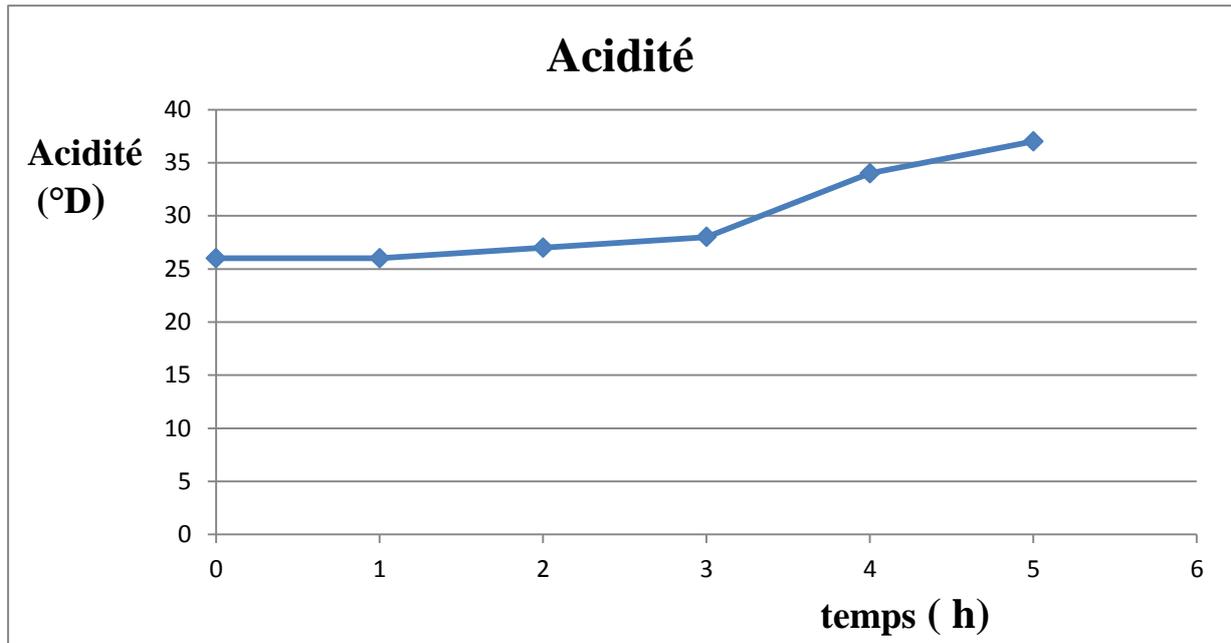


**Figure06** : Courbe de variation du pH des ferments lactiques.

Les résultats obtenus montrent que les souches lactiques provoquent une diminution du pH du lait de 6,2 à 5,8.

### 4.2. Détermination de l'acidité Dornic

L'évolution de l'acidité dornic produites par les souches utilisées (incubées à 30°C) est représentée par la **figure 07**.



**Figure 07** : la courbe d'évolution de l'acidité dornic.

Les résultats montrent une augmentation de l'acidité de 26 à 37 °D.

Les résultats de la cinétique d'acidification et la variation du pH nous permettent d'évaluer la cinétique de croissance et la quantité d'acide lactique produite par les deux souches lactiques étudiées.

Les résultats montrent une production finale d'acide lactique équivalente à 37°D, tandis que la valeur du pH diminue jusqu'à 5,8. L'évolution de l'acidité a été lente durant les premières heures de fermentation pour les deux souches.

La variation du pH est proportionnelle à la concentration des acides présents dans le milieu. La variation de ces deux paramètres liés est importante pour la technologie alimentaire.

**D'après Naouale (2008)**, Les bactéries lactiques qui ne se multiplient que dans le lait et dans les fromages assurent une fonction essentielle : abaisser le pH en transformant le lactose en acide lactique. **D'après Vingola (2002)**, les constituants du lait qui contribuent à l'acidité naturelle sont les phosphates, les caséines, les autres protéines, les citrates et le dioxyde de carbone. A cette acidité naturelle s'ajoute l'acidité développée qui est la résultante d'un développement des bactéries lactiques qui forment de l'acide lactique par fermentation du lactose.

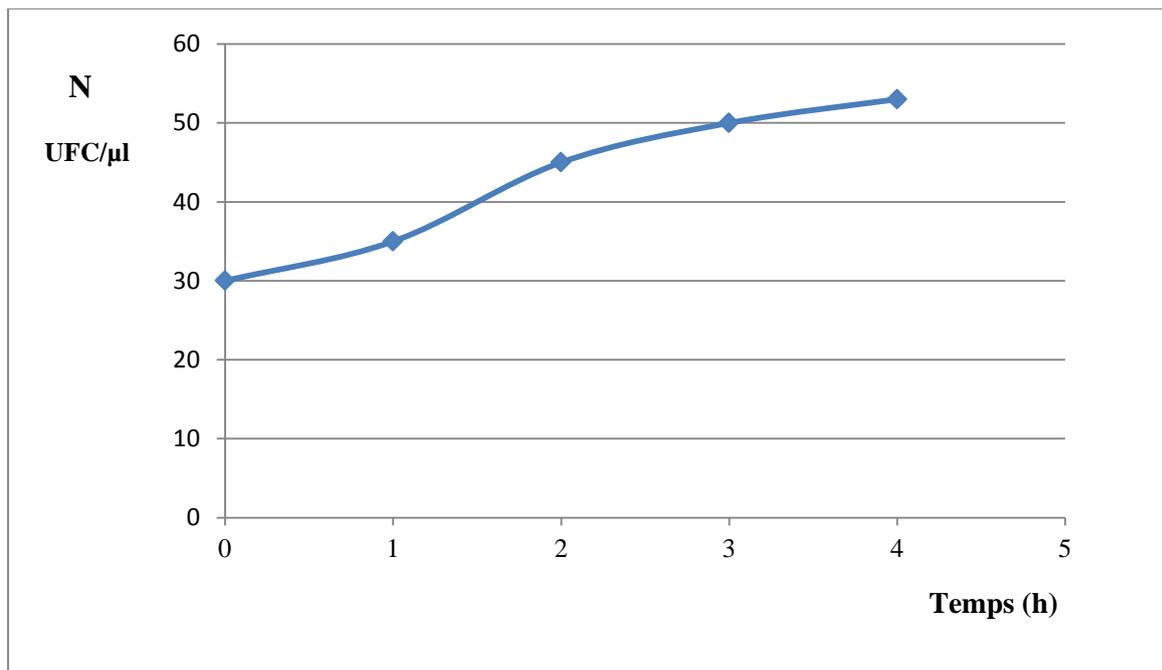
L'acide lactique est un acide suffisamment fort pour s'abaisser le pH d'une valeur mesurable.

Le lactose est indispensable lors de la fabrication fromagère, en effet le lactose est dégradé par les bactéries lactiques en acide lactique, cette acidification est nécessaire à la coagulation du lait (**Gauzère et al, 2004**).

### 4.3. Dénombrement des colonies



**Photo 14:** croissance bactérienne sur milieu MRS solide après incubation à 30°C



**Figure 08 :** Courbe de la cinétique de croissance.

**La figure 08** représente l'évolution du nombre de bactéries lactiques des deux souches (19D et SD17) en fonction du temps. L'analyse de la courbe montre pratiquement un seul segment qui peut correspondre à la phase exponentielle.

L'absence de la phase latence dans la courbe est due à l'adaptation au milieu lait écrémé pendant 24h d'incubation de la pré-culture.

Au cours de la phase de croissance exponentielle la production de biomasse atteint  $9,34 \cdot 10^7$  Ufc/ $\mu$ L tandis que la concentration initiale des souches était de  $3 \cdot 10^7$  Ufc/ $\mu$ L la cinétique d'apparition des produits de fermentation suit celle de la croissance, avec 3,7 g/L d'acide lactique produit par les souches SD17 et 19D. L'acidification du lait a lieu au cours de cette phase avec une baisse de pH jusqu'à 5,8.

## 5. Analyses physico-chimiques du fromage

Les résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur le fromage préparé à partir de lait recombinaé sont mentionnés dans le **tableau 05**.

**Tableau 05:** Mesure de pH et l'acidité du fromage.

Caractéristiques	pH	Acidité (D°)
Fromage	5.1	204

### 5.1. pH et l'acidité

Les résultats présentés dans le tableau 4 montrent que le pH de l'échantillon est de 5.1 Selon **Hamama et al, (1995)** les fromages frais doivent avoir un pH acide allant de 4.5 à 5.5.

D'après nos résultats, l'acidité titrable du fromage est égale à 204°D, cette valeur est supérieure à celle trouvée par **Hamama et al, (1995)** qui est 92,7°D. Cette valeur est plus élevée par ce que la mesure a été faite quatre jours après la fabrication du fromage (long weekend et la grève).

L'utilisation du lait recombinaé dans la préparation des fromages frais entraîne généralement une certaine lenteur dans l'activité des ferments, ce qui se répercute sur le pH et l'acidité titrable des produits finis (**Hamama et al, 1995**).

### 5.2. Calcul de rendement

Le rendement fromager ou le taux de transformation du lait en fromage est l'expression mathématique de la quantité du fromage obtenue à partir d'une quantité de lait donnée (**Eck et Gillis, 1997**).

Le rendement obtenu est de 20.75% ; cette valeur est supérieure à celle trouvée par **Reggad et al, (2016)** qui est 13,28%.

Selon **Gelais et al, (2002)**, le pourcentage du fromage récupéré dépend de deux facteurs : la quantité du lactosérum évacuée durant l'égouttage et la composition de la matière première en protéines et en matière grasse, en éléments minéraux ainsi que leur distribution entre le lactosérum et le coagulum. Plus le lait standardisé est riche en protéines et en matière grasse, plus le rendement est élevé.

## 6. Analyse organoleptique du fromage

D'après **Juliet (2014)**, le fromage frais est reconnaissable à sa blancheur, son aspect luisant, l'absence de croûte, sa texture souple et sa saveur laiteuse.

**Tableau 06 :** Caractères sensoriel.

<b>Caractère étudié</b>		<b>Fromage</b>
<b>Couleur</b>	Jaunâtre	<b>0</b>
	Jaune crémé	<b>0</b>
	Crème claire	<b>0</b>
	Blanchâtre	<b>100</b>
<b>Aspect</b>	Sec	<b>0</b>
	Hydratant	<b>50</b>
	Normal	<b>50</b>
<b>Texture</b>	Ferme	<b>0</b>
	Granulée	<b>0</b>
	Souple	<b>100</b>
	Onctueuses	<b>0</b>
<b>Gout</b>	Très bon	<b>70</b>
	Bon	<b>30</b>
	Moyen	<b>0</b>
	Acide	<b>0</b>
	Amères	<b>0</b>
	Rance	<b>0</b>
	Sale	<b>0</b>
<b>Odeur</b>	Lait cru	<b>90</b>
	Beurre	<b>0</b>
	Fromage	<b>10</b>
	L'ben	<b>0</b>
<b>Le fromage est :</b>		<b>Très bon</b>

La majorité des personnes interrogées (70%) lors de l'évaluation sensorielle estiment que notre fromage frais élaboré est de très bonne qualité ; quant à la couleur, tous les dégustateurs (100%) ont qualifiés le fromage de couleur blanchâtre. pour l'aspect et la texture la moitié a jugé le fromage hydratant et 100% ont caractérisé le fromage comme souple. L'odeur a été jugée par la majorité (90%) celle de lait cru.

La couleur blanchâtre dans le fromage montre la présence de la caséine dans le lait (**Moulay, 2015**).

## **Conclusion**

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire pour exploiter leur pouvoir acidifiant et aromatisant notamment dans la fabrication des fromages.

Les résultats obtenus lors de cette étude confirment, que les ferments lactiques ré-identifiés sont des Grams positifs, catalase négative, homofermentaires pour les Lactocoques et hétérofermentaires pour les Leuconostocs.

Les résultats des analyses physico-chimiques du fromage montrent que l'augmentation de l'acidité  $204^{\circ}\text{D}$  et une diminution de pH 5.1 durant la fermentation est due à la formation des différents acides organiques, le plus important c'est l'acide lactique venant à la dégradation des sucres par la flore lactique.

La majorité des dégustateurs ont apprécié ce type de fromage obtenu et l'ont évalué de bonne qualité organoleptique, d'une couleur blanchâtre, d'une odeur de lait cru, d'un aspect hydratant, de texture souple et de saveur très bonne.

Notre étude peut constituer une ébauche pour l'utilisation de la présure fixée sur la bentonite associée aux ferments lactiques et son utilisation à l'échelle industrielle.

## Références bibliographique

- **Abbes S, Amir H, Icher S. (2010).** *Cinétique d'acidification de quelques souches de bactérie lactiques isolées de lait cru de chèvre.* Mémoire de master. Université IBN KHALDOUN. Tiaret. 48 p.
- **Ait Abdelouahab N. (2001).** Microbiologie alimentaire. *édition office des publications universitaires.* Alger. Pp 101-103.
- **Alais C, Lagrange A. (1972).** Etude biochimique d'une protéase coagulante produite par *Mucor miehei*. I. Activité coagulante et activité protéolytique. *INRA Editions*, pp.407-427.
- **Alais C. (1974).** principes des techniques laitières : SCIENCE DU LAIT .*Edition : publicite*, Paris. 513p.
- André E, Jean-Claude G. (1997).le fromage. *éditions lavoisier technique & documentation.* Paris. p 802-803 -791
- **Badis A, Laouabdia-Sellami N, Guetarni D, Kihal M et Ouzrout R. (2004).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia et Kabyle ". *SCIENCES & TECHNOLOGIE*, 23 :30-37.
- **Bachir Boudjra Y , Riah S , Smaili K. (2016).**Essai de fabrication du fromage frais par coagulation mixte (Levains lactiques et présure).mémoire de master, Université IBN KHALDOUN.TIARET.58p.
- **Bassit N, Boquien C-V, Picque D, Corrieu G. (1993).** Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis. *Applied and Environmental Microbiology*. 1893-1897.
- **Bellil Y, (2013),** évaluation de l'effet des substances antimicrobiennes produites par *Leuconostoc mesenteroides* du lait cru de chamelle sur *Listeria spp* .mémoire de magister, université D'Oran ES-SENIA. Oran, 131p.
- **Benslama A, (2016) .**Génie enzymatique .mémoire de master. Université Mohamed Khider –Biskra.83p .7-9.
- **Boughellout H.(2007).**Coagulation du lait par la pepsine de poulet . Mémoire de Magistère. Université MENTOURI : Institut de la Nutrition de l'alimentation et des technologies Agro-Alimentaire. Constantine. P55. Proteolytic Enzymes. *ED.G.E.PERLMANN AND L.LORAND.PRESS INC. NEW YORK*, V.19,Pp347-358,1042P.
- **Bounder M, Habichi M.(2015).**Etude comparative entre fromage fabriqués à base de pepsine de poulet et de présure industriel. Mémoire d'ingénieur. Université Ibn Khaldoun . Tiaret, 43p.
- **Bourgeois C M, Muscle J F, Zucca J(1996)** microbiologie alimentaire. *Edition lavoisier.* Paris. Pp 277.
- **Bulard E. (2012).**L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire. thèse de doctorat. Université Paris Sud-Paris.185p
- **Camille D. (2007).**Microbiologie pratique pour le laboratoire. EDITION TEC et DOC LAVOISIER. Paris.pp101-128.

- **Debouz A, Guerguer I, Hamid A et Hadj Seyd A.(2014).** Étude comparative de la qualité physico-chimique et microbiologique du lait de vache et du lait camelin dans la wilaya de Ghardaïa. *El whatan pour les recherches et les Etudes*, 7(02) ; 10-17.
- **Denis F et ploy M. C . ( 2007).**Bactériologie médicale .*Edition masson* PARIS.p573.
- **ECK A ,( 1987 ).** le fromage *2 eme edition tec et doc. Lavoisier* .Paris.p101-227.
- **Federighi M. (2005).** Bactériologie alimentaire. *ECONOMICA*. Paris. Pp 224.
- **François-M L, Georges C. (2005).**Application des bactéries lactiques dans les produits laitiers frais et effets probiotiques .In *Bactéries lactiques et probiotiques* ( adited by S Pernoud , N Schneid-Citrain , V Agnetti , S Breton , J.M Faurie , L Marchal , D Obis , E Paquet , T Robinson ).pp1-5.*edition tec et doc.lavoisier*. Paris .
- **Georges C et François-marie L. (2008).** Génétique des bactéries lactiques. In *Bactéries. lactiques de la génétique aux ferments* (edited by P. Renault). Pp 153. Lavoisier. Paris.
- **Guessas B. et Kihal M. (2004).**caracterization of lactic acid bacteria isolated from algerian arid zone raw goat's milk .*African Journal of Biotechnology* Vol.3(6),339-342.
- **Guirand J, (1998).** *Microbiologie Alimentaire* .Ed Dunod , Paris.
- **Haffane S, Achak O , Chafik T.(2016).**Etude de l'effet de purification et de modification d'une argile locale sur les propriétés structurales ( Investigation of the effect of purication and modification of a local clay on its stuctural and texural properties ). *J.Mater.Environ.Sci.*7(2).525-530.
- **Hamama A. Zahar M. Emarrakchi A. Aboulala F. Bent mohamed abderhm M. (1995).** Préparation du fromage frais à partir du ait recombiné. Pp 22-23.
- **Haytem J.(2011),** Bio-électrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles. thèse de doctorat, Montpellier 2. Montpellier, 165.
- **Juliet .H.(2014).**Le grande livre des fromages. *Editions milan*. Toulouse codex 9. p 6-7.
- **Kanza Z, Zineb B, Miloud H, Boumediene M-B, Jamal E-H et Mebrouk K.(2012)** Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nature & Technologie*, 8 p 41.
- **LTD : DANISH TURNKEY DAIRIES.** Technologie laitiere.Ed: Europa lads.
- **Mathieu. J (1998).** Initiation à la physicochimie du lait .*Editions lavoisier technique & documentation*. Paris. p 181.
- **Michael M et John M. (2007).** Biologie des micro-organismes. Nouveaux Horizons-ARS. Paris. Pp
- **Molay M, (2014),** contribution à l'étude et la caractérisation des lactocoques indigènes isolés du lait cru de chèvre et les produits laitiers Algériens. Thèse de doctorat, université d'Oran.125.
- **Nouani A, Dako E, Morsli A, Belhamiche N, Belbraouet S, Bellalm M et Dadie A (2009) .** Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers ( *Cynara scolymus* ) and from the fig tree latex ( *Ficus carcia*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria . *J .Food Technol.*, 7: 20-29.

- **Ouazzani tayebi N, Arfaoui A et Fadli M. 2014.** évaluation de la qualité microbiologique du lait cru dans la région du Gharb, Maroc. *International journal of innovation and scientific research*, 9(02); p 487-493.
  
- **Quasem J M , Mazahreh A S , Abdullah I. and Al Omari A. (2009).**Solubility of solar dried jameed. *Pakistan Journal of Nutrition* .2(8): 134-138..
  
- **Ramet J.P.(1997 )**,.les agents de transformation du lait ;la présure et les enzymes coagulantes In. Le fromage .ed . a. eck, 3<sup>ème</sup> ed. tec et doc, LAVOISIER. Pp101-107,539p.
- **Rhiat M, Labiouil H, Driouich A, Anouane M, Chbabl Y, Mennene Z et Ouhssine M. 2011.** Etude bactériologique comparative des fromages frais marocains commercialisés (mahlabats) et des fromages fabriqués au laboratoire. *Afrique science*, 7(03) ; p 108-112.
- **Robert W , Hutkins ,(2006).**Microbiology and technology of fermented goods .IFS press et black well publishing .20-25.
- **Romain J. Thomas C .Michel M. Pierre S. Gérard B. (2008).**Les produits laitiers. Lavoisier. Paris. Pp 1-3.
- **Seme K, Pitala W et Osseyi E. 2015** qualité nutritionnelle et hygiénique de laits crus de vaches allaitantes dans la région maritime au sud –Togo. *Européen scientific journal*, 11(36) ; 359-376.
- **Schmidt D.G, (1982).** *Association of caseins and casein micelle structure.* Developments in dairy chemistry, Applied science publisher, London, 61-86.
- **Tsouli J. (1979).**Etude d'une protéase coagulante extraite de *Cynarascolymus* et de *Cynaracardunculus* , adaptation de la méthode conductimétrique pour la détermination de temps de coagulation du lait et le contrôle des fabrications . Doctorates-sci., Univ. C. Bernard, Lyon, 1-62.
- **Vandewegh J. (1997).** Le rendement en fromage : prédétermination et mesure, in ECK le fromage . 2<sup>ème</sup> édition *Tec et Doc Lavoisier*, pp : 971-874.
- **Vingola C.L (2002).**Science et technologie de lait ; transformation de lait protéolytique de Montréal. Canada.
- **Wiegand I , Hilpert K , and Hancock R. (2008).**Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature & protocols* .3(2): 163-175.
- **Zarour K , Benmecherne Z , Hadadji M , boudjemmee B.M , Henni J , Kihal M.(2013).**Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nature and Technologie*. 8 :39-49.

## Annexe 01

### Préparation des milieux de cultures

#### Milieu MRS

Il est utilisé pour le dénombrement de la flore lactique en particulier les *Leuconostoc* :

#### Formule

- Peptone.....10g
- Extrait de viande.....10 g
- Extrait de levure déshydraté.....05g
- Glucose.....20g
- Ester oléique de sorbitol.....1mL
- Phosphate di- potassique.....02 g
- Acétate de sodium 3 H<sub>2</sub>O.....05 g
- Citrate daïmonique.....02 g
- Sulfate de magnésium, 7H<sub>2</sub>O.....0,2 g
- Sulfate de magnésium.....0,05g
- Gélose.....9 à 18 g
- Eau distillé.....100mL

#### Préparation

- Dissoudre les composants dans l'eau à l'ébullition, laisser refroidir à 50°C
- Ajuster le pH à l'aide d'acide acétique de sorte qu'après stérilisation, il soit de 5,4 à 25°C
- Répartir à raison de 100ml par fiole de 125

#### Milieu M17

- Extrait de levure .....2,5g
- Extrait cde viande .....05 g
- Peptone trypsique de caséine.....2,5g
- Peptone pepsique de viande.....2,5g
- Peptone papainique de soja .....05g
- Lactose.....05g
- B glycérophosphate de sodium.....19g
- Sulfate de magnésium.....0,25g
- Acide ascorbique.....0,5g
- Eau distillée.....950mL
- pH.....7,2
- Stérilisation à 120°C pendant 20min

### Gélose MRS

- Peptone.....10g
- Extrait de viande ..... 10g
- Extrait de levure.....05g
- Glucose.....20g
- Tween 80..... 1mL
- Phosphate bi-potassique.....02g
- Acétate de sodium.....05g
- Citrate d'ammonium.....02g
- Sulfate de magnésium, 7 H<sub>2</sub>O.....0,2g
- Sulfate de manganèse, 4 H<sub>2</sub>O.....0,5g
- Agar.....15g
- Eau distillée qsp.....1000mL

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15min.

### Lait écrémé

- Lait écrémé ..... 10g
- Extrait de levure.....0.5g
- Eau distillée ..... 100mL
- pH.....7

Autoclavage à 100°C pendant 10 minutes

### Eau physiologique stérile

- Eau distillée ..... 100mL

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes

## Annexe 02

### Coloration de gram

#### Mode opératoire

- Fixation

Préparation un frotti d'une culture bactérienne pure

- Coloration primaire

Recouvrir le frotti de violette gentiane ; laisser agir 1 min ; rincer à l'eau distillée

- Mordançage

Verser du Lugol et le laisser agir pendant 1 min ; rincer à l'eau distillée

A ce stade le cytoplasme de toutes les bactéries est coloré en violet

- Différenciation

Décolorer à l'alcool entre 15 à 30 secondes ; rincer à l'eau distillée

A l'issue de cette étape ; les bactéries gram positif sont colorées en violet, les bactéries gram négatif sont incolores

- Coloration de contraste (secondaire)

Recolorer avec la fushine pendant 10 à 30 seconde ; rincer à l'eau distillée ; sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen

Observer au microscope à l'objectif×100 par l'ajout des gouttes de l'huile Immersion

Avec cette coloration double, les bactéries gram positif appartiennent en violet foncée tandis que les bactéries gram négatif sont colorées en rose ou rouge

#### Pré-culture

La souche *Leuconostoc* standardisé.....1mL

La souche *lactococcus* standardisé.....1mL

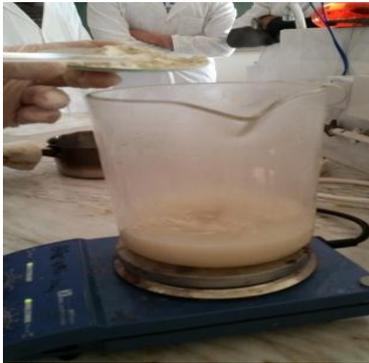
Lait écrémé.....9mL

#### Mode d'opératoire

- Agitation
- Incubation 30°C pendant 24 heures

### Annex 03

#### Purification d'argile :



**Photo 15** : préparation du suspension d'argile 20g d'argile dans 1L d'eau distillé



**Photo 16**: agitation de la suspension d'argile pendant 2h.



(A)



(B)

**Photo 17** : (A) décantation de la suspension d'argile pendant 24h. (B) récupération de 400ml de surnageant par siphonage.



**Photo 18:** filtration du 50ml de la suspension d'argile a l'aide d'une pompe à vide.

**Annexe 04**

**Conservation des souches à court terme et à long terme**



**(A)**



**(B)**

**Photo 19:** conservation des souches. (A) conservation à long terme, (B) conservation à court terme.

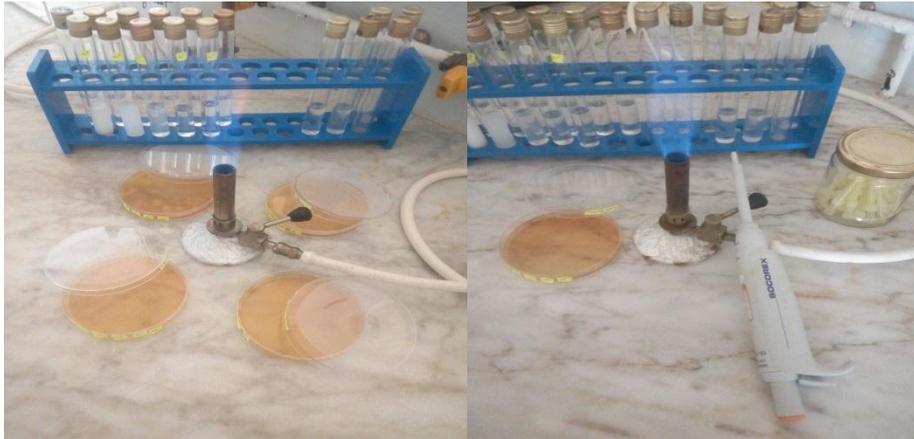
**Tableau 07 :** variation du pH des ferments.

Nombre du tube	Tube 1	Tube2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6
pH	6.2	6.1	6	6	5.9	5.8

**Tableau 08** : détermination de l'acidité dornic des ferments.

Nombre du tube	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6
°D	26	26	27	28	34	37

**Technique de micro-spots**



**Photo 20** : technique de micro-spots

**Annexe 05**

**Lait en poudre utilisé**



**Photo 21** : poudre du lait utilisée.

## Analyses physico-chimiques du lait

### Mesure de pH



**Photo 22** : mesure de pH du lait.

### Détermination de la densité



**Photo 23**: détermination de la densité du lait.

Détermination de l'acidité dornic



Photo 24 : détermination de l'acidité dornic du lait.

## Résumé

Notre étude vise à fabriquer un fromage frais à partir de lait reconstitué pasteurisé sous l'action combinée de l'enzyme immobilisée (chymosine) et les ferments lactiques (*Leuconostoc mesenteroides* et *Lactococcus diacetylactis*) et évaluer leur effet sur les qualités organoleptiques et le rendement en fromage. Nous avons utilisées la chymosine industrielle (chymosine en poudre) fixée sur un support inorganique « argile », et deux souches lactiques *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactococcus diacetylactis*. D'après les résultats des analyses physicochimiques du lait on constate que ce dernier est légèrement acide (24°D) et acceptable pour les critères : pH (6.3), densité(1.030). Convenable à la fabrication des fromages, Les résultats des analyses physico-chimiques du fromage montrent que l'augmentation de l'acidité durant la fermentation (204°D) et une diminution de pH jusqu'à 5.1. Les analyses sensorielles de fromage obtenu montrent que ce fromage est de bonne qualité organoleptique, distingué par sa couleur blanchâtre, son aspect hydratant, sa texture souple et son odeur de lait cru.

## ملخص

هذه الدراسة تهدف الى صنع جبن طازج ابتداء من بودرة الحليب المعقمة عن طريق عملية المزج بين انزيم مثبت و الخمائر اللبنية (*Leuconostoc mesenteroides* et *Lactococcus diacetylactis*) ، كما تهدف الى تقييم تأثير هذه العملية على نوعية و حاصل الجبن. لذلك لقد استخدمنا انزيم chymosine الصناعي مثبت على دعامة لا عضوية طين و نوعين من الخمائر اللبنية *Leuconostoc mesenteroides* و *Lactococcus diacetylactis* . نتائج التحاليل الفيز و كيميائية للحليب دلت على ان هذا الاخير حامض نوعا ما (24°D) و مقبول في الخصائص التالية pH (6.3) و الكثافة (1.030). النتائج التحاليل الفيز و كيميائية للجبن تدل على ارتفاع نسبة الحموضة خلال التخمير 204 و انخفاض Ph5.1، كما اظهرت التحاليل الحسية للجبن انه ذو نوعية جيدة مميز بلون ابيض و طراوته و ليونة وله رائحة الحليب الطازج.

الكلمات المفتاحية: بودرة الحليب المعقمة، انزيم، تثبيت، خمائر لبنية، جبن طازج.الطين.