

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 :

-BOUATTOU KHALID

-ZERAKNI BAHAA EDDINE

-HAMEURLAINE ILIYAS

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

JURY:

-Président : Mr Hocine L.

-Promoteur: M^{elle} Moulay M.

-Co-promoteur: Mr Benbeguara M.

-Examineurs: Mr Hadj Said A.

Grade :

MAA

MCB

MAA

MCA

Année universitaire: 2016–2017

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail en signe de reconnaissance,

■ *A mon très cher père (**Fares**) qui est à l'origine de ce qui je suis.*

■ *A ma chère mère (**Nacera**) qui s'est toujours sacrifiée pour mon éducation, qui m'a entourée de son amour et de son affection, je la remercie et je n'oublierai jamais son soutien moral dans les moments les plus difficiles, que Dieu la protège.*

■ *A mon chère frère Ahmed ,et a mes chères sœurs Hadjer et Rihab*

■ *A toute ma famille Zerakni et Taibi*

■ *A tous mes amis : Tayeb , Djamel , Aek, Brahim, Amin, Khaled, Iliyas , Zaki ,Med ,Bastani, Ahmed, Hamadou*

■ *A mes chère Hasna et kheira*

■ *A mes enseignants : Dr Doukani Koula , Mr Houcin , Mr Benbguera ,Mr Hadj Said surtout, surtout au docteur Moulay Meriem pour m'avoir donné l'esprit de compétence.*

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

Zerakni Bahaa

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail en signe de reconnaissance,

- *A mon très cher père (**Miloud**) qui est à l'origine de ce qui je suis.*
- *A ma chère mère (**Badra**) qui s'est toujours sacrifiée pour mon éducation, qui m'a entourée de son amour et de son affection, je la remercie et je n'oublierai jamais son soutien moral dans les moments les plus difficiles, que*

Dieu la protège.

- *Ames chères frères **Hawari, Mohamed** ,et Ames chères sœurs **Baraa et Anfal***

- *A toute ma famille **hameurlaine et ismail***

- *A tous mes amis : **Khalid, bahaa , Abdou, Tayeb , Djamel , Brahim, Amine, , Zaki , Med , Bastani, , abdhadi, Rida***

- *A mes chère **Hasna et kheira***

- *A mes enseignants : **Mr Houcin , Mr Benbguera , Mr Hadj Said** surtout, surtout au docteur **Moulay Meriem** pour m'avoir donné l'esprit de compétence.*

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

H.AMEURLAINE ILIY:AS

Dédicace

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à l'aide de dieu
tout puissant;*

** À mes grand- parents maternels et paternels;*

** À mon très cher père **Madani**, pour sa confiance, ses encouragements et
son soutien dans toute ma carrière d'étude dès le premier pas jusqu'à ce
jour-là.*

** À la source de la tendresse, ma mère **Mebarka**, pour sa gentillesse sa
douceur, pour son affection, son amour ses sacrifices et ses
encouragements.*

** À Mes chères sœurs : Malika ; Houria et Ghania*

** A Mes cher frères : Mohammed et Mounir*

** À mes oncles et tantes paternels et maternels*

** Au reste de ma famille*

** Aux techniciennes de laboratoire de microbiologie : Kheira et Hasna, je
vous dis merci beaucoup*

** À mes amies surtout Iliyas, Bahaa, Tayeb, Kader, Amine, Ibrahim,
Ahmed, Yassine et Mohamed pour tous les bon moments que nous avons
partagés*

** A toute la promotion master II 2016-2017 / Spécialité: « Sciences des
procédés biotechnologiques et agroalimentaires »*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit
possible.*

Khalid



Remercîment

Avant toute chose, on remercie Dieu, tout puissant, pour nous avoir donné le courage, et la patience pour faire aboutir ce travail.

En préambule à ce travail, nous souhaiterons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Nous exprimons notre profonde gratitude à M^{elle} Moulay Meriem, la promotrice de notre mémoire, pour ses conseils, ses compétences scientifiques, son attention de tout instant sur notre travail et sa patience.

Nous adressons de chaleureux remerciements à notre Co-promoteur, Mr Benbeguara Mourad, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants.

Nous tenons à remercier les membres du Jury particulièrement Monsieur Hocine qui nous a fait l'honneur de présider ce jury et Monsieur Hadj Said d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Nos remerciements vont également à tous les techniciens du laboratoire de Microbiologie et de Technologie alimentaire de la Faculté des Sciences de la nature et de la Vie de l'Université

Ibn Khaldoun-Tiaret



Table de matière

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des photos.....	III
Liste des abréviations	IV
Introduction	1

Synthèse bibliographique

1. Coagulation du lait.....	2
1.1. Coagulation par voie acide.....	2
1.2. Coagulation par voie enzymatique.....	3
1.3. Coagulation mixte.....	3
2. Fromage frais.....	3
2.1. Différents types de fromage frais.....	3
2.1.1. Fromage blanc.....	3
2.1.2. Petit suisse.....	3
2.1.3. Les fromages frais salés.....	3
2.1.4. Les fromages à tartiner.....	3
3. Bactéries lactiques.....	3

Partie 1 : Matériel et méthodes

1.1. Objectif du travail.....	4
1.2. Lieu et période de travail.....	4
1.3. Matériel et méthodes.....	4
1.3.1. Matériel	4
1.3.1.1. Matériel biologiques.....	4
1.3.1.2. Matériel, appareillages et produits utilisés.....	5
1.3.2. Méthodes	6
1.3.2.1. Protocole expérimental.....	6
1.3.2.2. Ré-identification des souches	7
1.3.2.2.1. Purification des souches.....	8
1.3.2.2.2. Étude morphologiques.....	8
a. Examen Macroscopique.....	8
b. Examen microscopique.....	8
1.3.2.2.3. Étude biochimique	8
a. Test catalase.....	8
b. Type fermentaire.....	9
1.3.2.2.4. Conservation des souches à courte terme.....	9
1.3.2.3. Analyse physico-chimique du lait.....	10
1.3.2.3.1. Préparation du lait.....	10
a. Mesure de pH.....	11
b. Détermination de la densité.....	11
c. Détermination de l'acidité titrable.....	12
1.3.2.4. Activité enzymatique	12
1.3.2.4.1. Mesure du temps de floculation.....	12

1.3.2.4.2. Détermination de l'activité coagulante.....	12
1.3.2.4.3. Estimation de la force coagulante.....	13
1.3.2.4.4. Détermination du temps de prise.....	13
1.3.2.5. Fabrication de fromage frais.....	14
a. Préparation des pré-cultures.....	14
b. Emprésurage.....	14
c. Coagulation.....	14
d. Tranchage.....	15
e. Brassage.....	15
f. Égouttage.....	16
g. Salage.....	16
h. Moulage.....	17
i. Conservation.....	17
1.3.2.6. Étude de la cinétique des souches.....	17
a. Étude de la cinétique d'acidification.....	17
b. Étude de la cinétique de croissance.....	17
1.3.2.7. Analyses physico-chimiques du fromage frais.....	18
a. Mesure du pH.....	18
b. Mesure de l'acidité titrable.....	18
1.3.2.8. Rendement fromager.....	18
1.3.2.8. Évaluation sensoriel du fromage frais.....	19

Partie 2 : Résultats et discussion

2.1. Ré-identification des souches.....	20
2.1.1. Étude morphologique.....	20
a. Tests macroscopiques.....	20
b. Tests microscopiques.....	21
2.1.2. Étude biochimiques.....	22
a. Test de catalase.....	22
b. Type fermentaire.....	22
2.2. Analyses physico-chimiques du lait.....	23
2.2.1. Mesure du pH.....	23
2.2.2. Acidité titrable.....	24
2.2.3. La densité.....	24
2.3. Activité enzymatique.....	24
2.3.1. Mesure du temps de floculation.....	24
2.3.2. Détermination de l'activité coagulante.....	25
2.3.3. Détermination de la force coagulante.....	25
2.3.4. Détermination du temps de prise.....	25
2.4. Résultats de la cinétique d'acidification et de croissance.....	25
2.4.1. Cinétique d'acidité des souches.....	26
2.4.2. Suivi de la cinétique de croissance.....	27
2.5. Analyse physicochimique du fromage.....	29
2.6. Rendement fromager.....	29

2.7. Résultats des analyses organoleptiques du fromage frais fabriqué.....	30
Conclusion.....	31
Références bibliographiques.....	32
Annexe	

Liste des tableaux

Titres	page
Tableau 01. Appareillage, verreries, produits chimiques et autres.....	05
Tableau 02. Ré -identification des souches.....	20
Tableau 03. Caractéristiques physico-chimiques du lait entier.....	23
Tableau 04. Caractérisation de l'enzyme utilisé.....	24
Tableau 05. Analyses physico-chimiques du fromage.....	29
Tableau 06. Évaluation sensorielle du fromage (test de dégustation).....	30

Liste des figures

Titres	pages
Figure 01. Protocol expérimentale.....	06
Figure 02. Purification et ré-identification des souches	07
Figure 03. préparation du lait.....	10
Figure 04. Cinétique d'évolution de pH de (SD17 ,19D) cultivées sur milieu lait à 30°C	26
Figure 05. Cinétique d'évolution de l'acidité dornic de (SD17 ,19D) cultivées sur milieu lait à 30°C	26
Figure 06. Cinétique de croissance des souches <i>Leuconostoc</i> et <i>Lactococcus</i> dans le lait à 30°C.....	28

Liste des photos

Titres	Page
Photo 01. Coagulation du lait.....	14
Photo 02. Tranchage du caillé.....	15
Photo 03. Brassage du caillé.....	15
Photo 04. Égouttage du caillé.....	16
Photo 05. salage en saumure	16
Photo0 6. moulage de fromage.....	17
Photo0 7. Aspect de culture pure des lactocoques, en milieu MRS liquide, la culture se développe mieux en profondeur ou la pression de l'Oxygène est faible.....	21
Photo 08. Aspect des colonies des bactéries lactocoques obtenues après 24h d'incubation à 30°C sur milieu MRS solide.	21
Photo 09. Aspect microscopique et arrangement des isolats après coloration de Gram (X100).....	21
Photo 10. Test de catalase.....	22
Photo 11. Test de type fermentaires des souches : Lactococcus diacetylactis (SD17) et Leuconostoc mesenteroides (19D).....	23
Photo 12. Aspect des colonies sur milieu MRS solide (technique des micro-spots)...	27
Photo 13. Fromage frais préparé.....	31

Liste des abréviations

- **°D**: Degré Dornic
- **AFNOR** : Association Française de Normalisation
- **FAO**: Food and Agricultural organization
- **MG**: Matière grasse
- **MRS**: Man, Rogosa et Sharpe
- **NaCl** : Chlorure de sodium
- **NaOH** : Hydroxyde de sodium
- **pH**: potentiel d'hydrogène
- **UFC**: Unité formant colonie
- **DO**: Densité Optique

Introduction

Introduction

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères comme la vache, la chèvre et la brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant (**Vignola, 2002**). Il représente un milieu biologique fortement altérable par voie microbienne en raison de sa forte teneur en eau, de son pH voisin de sa neutralité et de sa richesse en composants biodégradables. La méthode de conservation la plus simple est de le transformer en fromages (**Henri et al., 2006**). Parmi eux, le fromage frais qui est prêt à la consommation, peu de temps après fabrication. (**Luquet et Corrieu, 2005**)

L'étape clé de la réussite d'un fromage est la coagulation, modification physico-chimique des micelles de caséine, entraînant la transformation du lait en gel (**Eck et Gillis, 1997**). Les propriétés du gel formé diffèrent, selon la nature de l'agent coagulant et le type de fromage. En fromagerie, il existe essentiellement deux types de coagulation, l'une lactique et acide, réalisée à l'aide de ferments lactiques, les plus utilisées sont *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc mesenteroides* (**Luquet et Corrieu, 2005**), par la dégradation du lactose en acide lactique, et l'autre enzymatique par dégradation de la caséine κ par la présure ou autre succédané.

À fin de maîtriser les conditions optimales de la fabrication du fromage, nous avons pensé à lancer un travail qui consiste à un essai de fabrication d'un fromage frais de qualité en utilisant de l'enzyme (chymosine) et des ferments lactiques (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*).

Synthèse

bibliographique

1. Coagulation du lait

La coagulation du lait résulte de l'association des micelles de caséine plus au moins modifiées. Cette agglomération mène à la formation d'un coagulum dont le volume est égal à celui du lait mis en oeuvre. Ces modifications physico-chimiques des caséines sont induites soit par acidification soit par action d'enzymes coagulantes (**Gastaldi-bouabid, 1994**).

1.1. Coagulation par voie acide

La coagulation par voie acide est provoquée par l'acide lactique d'origine bactérienne, qui transforme le lactose en acide lactique. Le pH du lait de fromagerie diminue avec la production d'acide. Ce qui provoque une solubilisation du phosphate et du calcium colloïdal, un élément important dans la stabilité des micelles de caséine. Ces dernières vont se lier entre-elles et former un gel cassant très friable et peu élastique (**Mietton, 1995**). Si l'acidification est rapide par addition d'un acide minéral ou organique, il y a floculation des caséines à pH 4,6 sous la forme d'un précipité plus ou moins granulé dispersé dans le lactosérum. Par contre, une acidification progressive, obtenue soit par fermentation lactique, soit par hydrolyse de la gluconolactone, conduit à la formation d'un gel lisse homogène qui occupe entièrement le volume initial du lait (**Mietton et al., 1994**).

La teneur en protéines agit sur la coagulation acide. Un lait riche en protéines formera un caillé lactique plus ferme (**Carole et Vignola, 2002**).

1.2. Coagulation par voie enzymatique

Il existe un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou microbienne qui ont la propriété de coaguler le lait. Dans ce contexte, la présure (mélange de chymosine et de pepsine secrété dans la caillette des jeunes ruminants nourris au lait) est l'enzyme coagulante la mieux connue (**Eck et Gillis, 1997**), son mécanisme d'action est assez bien établi et comporte 02 phases (**Vingnola, 2002**).

- La phase primaire (enzymatique) où la présure attaque la liaison Phe105-Met106 de la caséine κ , en libérant un peptide (caséinomacropéptide) et par conséquent, la déstabilisation de la micelle de caséine (**Horne, 2002**).
- La phase secondaire (coagulation), où les micelles modifiées s'associent entre elles en présence de calcium pour former un gel (**Brule et al., 1997**).

Le gel présure est souple, élastique, cohérent, imperméable et contractile (**Veisseyre, 1979**).

1.3. Coagulation mixte

Résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification, la multitude de combinaisons conduisant à différents états d'équilibre spécifique est à l'origine de la grande diversité des fromages à pates pressée non cuite (**Jeantet et al., 2006**).

2. Fromage frais

Les fromages frais sont des fromages à égouttage lent, n'ayant subi que la fermentation lactique obtenue avec des laits ou des crèmes propres à la consommation humaine (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

2.1. Différents types de fromage frais

2.1.1. Fromage blanc : c'est un fromage non affiné. S'il est fermenté, seule la fermentation lactique est autorisée. sa teneur en matière sèche peut être inférieure à 23g/100g en fonction du % d'humidité.

2.1.2. Petit suisse : actuellement sur le marché il existe deux conditionnements de petit suisse : le petit suisse de 30 g (de moins en moins commercialisé) et le petit suisse de 60g.

2.1.3. Les fromages frais salés : leur teneur en matières grasses varie de 0% à 60%. Exemples : demi-sel, Carré frais.

2.1.4. les fromages à tartiner : ce sont des spécialités à base de fromage frais ou de fromage blanc contenant divers ingrédients. Exemple : Saint-Moret. (**Fredot, 2009**).

3. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilli (**Badis et al., 2005**). Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulantes, aéro anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme.

➤ Classification

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* (**Dortu et Thonart, 2009**).

Matériel et méthodes

1.1. Objectif du travail

Notre travail a pour objectif l'essai de fabrication d'un fromage frais sous l'action combinée de l'enzyme (Chymosine) et des ferments lactiques (*Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar.*diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp.*mesenteroides*). Ensuite il s'agit de déterminer le temps et les conditions optimales de l'activité coagulante des bactéries lactiques, de l'enzyme, ainsi que le rendement fromager.

1.2. Lieu et période de travail

Les travaux présentés dans cette étude ont été effectués au sein de laboratoire de microbiologie, biochimie et technologie alimentaire, au niveau de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun- Tiaret. Pendant une période allant du 19/02/2017 au 15/05/2017.

1.3. Matériel et méthodes

1.3.1. Matériel

1.3.1.1. Matériel biologique

a. Souches utilisées

Les souches utilisées dans notre expérimentation sont :

Lactococcus lactis subsp.*lactis* biovar.*diacetylactis* (SD17)

Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* (19D)

Qui possédant une activité protéolytique et proviennent de la collection de laboratoire de microbiologie (LMA) de l'université d'Oran Es-Senia. Elles ont été isolées à partir du lait cru de chèvre provenant des fermes de différentes régions de l'ouest d'Algérie (Tiaret et Oran).

b. Lait : est un lait entier à 25% de MG en poudre de marque CILIA.

c. Lait écrémé : c'est un lait écrémé en poudre provient de GIPLAIT Tiaret

d. Enzyme : Chymosine (EC 3.4.23.4). Provient de GIPLAIT Tiaret

1.3.1.2. Matériel, appareillages et produits utilisés

Le matériel utilisé dans notre expérimentation est présenté dans le **tableau (01)**

Tableau 01 : Appareillage, verreries, produits chimiques et autres

Appareillage	Verreries	Produits chimiques et milieux de cultures	Autres matériels
<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) - Thermolactodensimètre - Thermomètre -vortex (TechnoKartell) 	<ul style="list-style-type: none"> - Béchers - Burette - Entonnoir - Erlenmeyer - Eprouvettes graduées - Flacon - Lames - Pipettes graduées (2, 5 et 10ml) - Pipette Pasteur - Tubes à essai 	<ul style="list-style-type: none"> - Agar - Eau distillée - Eau oxygénée (H₂O₂)99.8% - Éthanol 96% - Extrait de levure - Fuch sine de Ziehl - Lugol - Phénolphtaléine, - Sel de cuisine - NaOH (N/9) - Violet de gentiane <p>Milieux de culture :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Milieu M17 (liquide et solide) (annexe 01) -Milieu MRS (liquide et solide) (annexe 02) 	<ul style="list-style-type: none"> - Anse de platine ; - Seringues ; - Spatule ; -Bec bunsen ; -Boîtes de Pétrie ; -Barreau magnétique ; -Cloche du Durham ; -Pince à boit ; -pissettes ; -papier aluminium ; -Papier hygiénique ; - Micropipette

1.3.2. Méthodes

1.3.2.1. Protocole expérimental

Le protocole expérimental de notre expérimentation est présenté par la **figure (01)** :

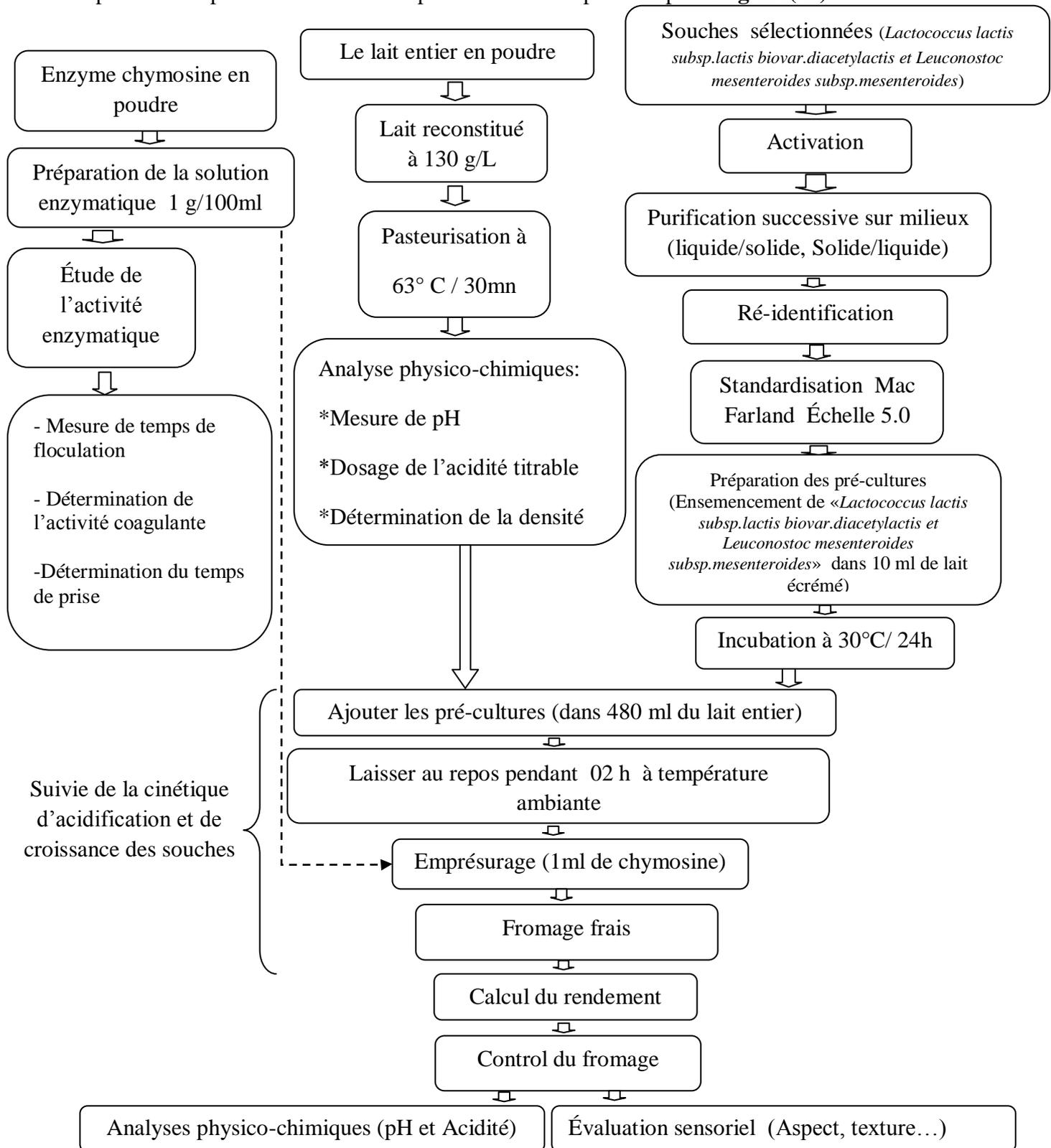


Figure 01 : Protocole expérimental

1.3.2.2. Ré-identification des souches

La figure (02) montre les principales étapes de la purification et la ré-identification des isolats étudiés.

La ré-identification a été réalisée suite aux résultats de l'examen macroscopiques (l'aspect, la forme et la couleur des colonies) et microscopique (coloration de Gram, forme et arrangement des cellules) ainsi que les tests biochimiques. Ensuite, les souches purifiées sont cultivées sur milieu spécifique incliné puis conservées à 4 °C de 3 à 4 semaines. (Moulay *et al.*, 2013).

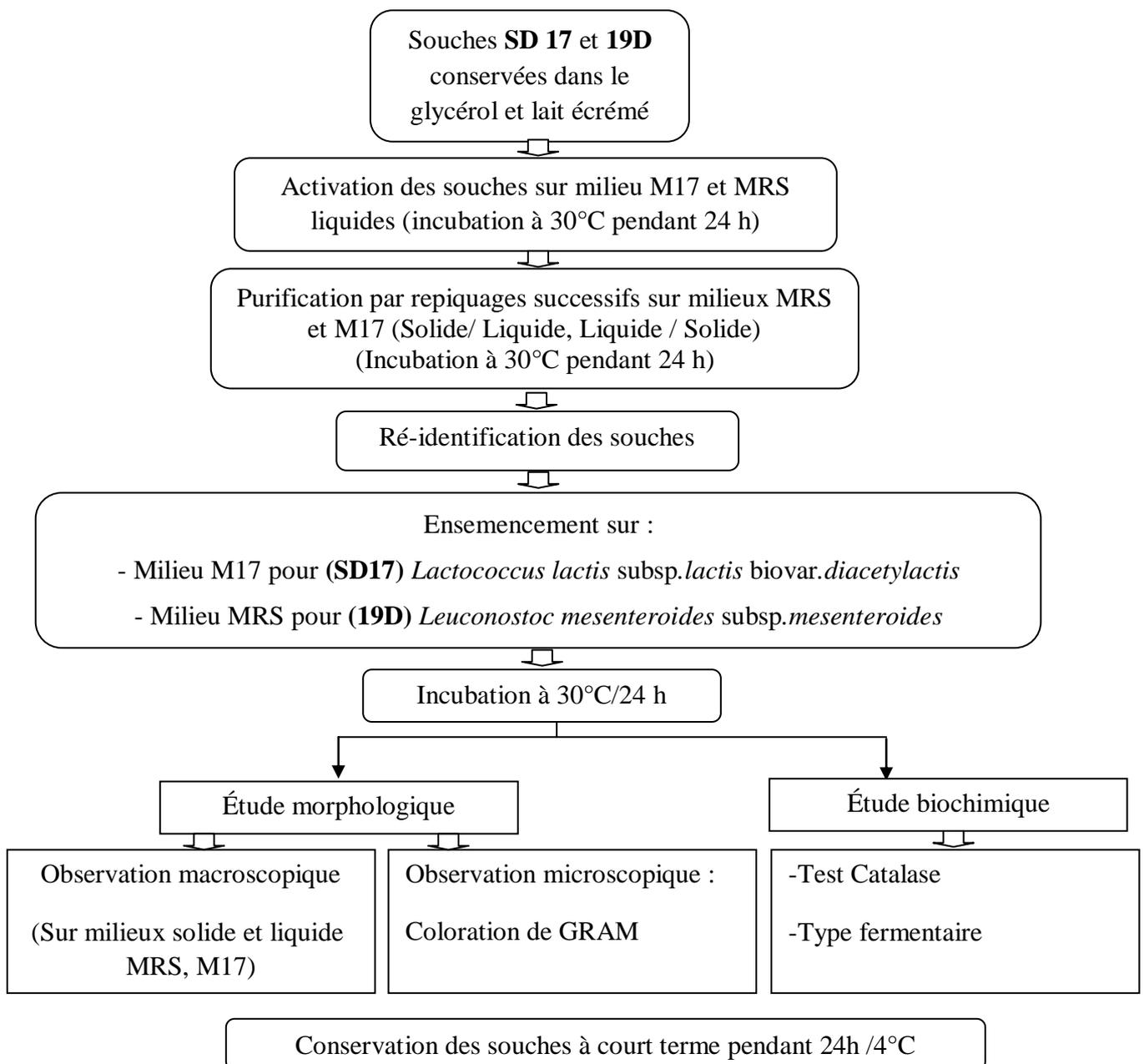


Figure 02 : Purification et ré-identification des souches

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

- prendre une goutte d'inoculum dans 5 ml de milieu de croissance, le plus souvent M17 bouillon pour les *lactocoques* et MRS pour les *leuconostocs* ;
- incubation à 30°C pendant 24 h ;

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

1.3.2.2.1. Purification des souches

La purification des bactéries lactiques est réalisée alternativement sur les milieux (MRS et M17) solide et liquide afin de s'assurer de la pureté des cultures (colonie identique), (**Badis et al., 2005**).

1.3.2.2.2. Étude morphologiques

a. Examen Macroscopique

Cette étude est basée 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 ainsi l'aspect du trouble dans le milieu liquide (**Badis et al., 2005**).

b. Examen microscopique

Cette étude est pour écarter tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (**annexe 03**), permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, morphologie et le mode de regroupement (**Singleton, 1999**).

1.3.2.2.3. Étude biochimique

a. Test catalase

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase négatif) des autres bactéries (catalase positif). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame propre. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O₂) (**Marchal et al., 1991**).

b. Type fermentaire

Ce test permet de savoir le type du métabolisme (homofermentaire ou hétérofermentaire) par lequel le substrat carboné est transformé, et la production du gaz à partir de la dégradation du glucose. Ce test est effectué par l'ensemencement des souches dans un milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de Durham est l'incubation à 30°C pendant 24h à 48h. Le développement d'une bactérie hétérofermentaire se manifeste par l'apparition de gaz dans la cloche de Durham qui est absent chez les bactéries homofermentaires, (**Bourgeois *et al.*, 1996**).

1.3.2.2.4. Conservation des souches à court terme

La conservation à court terme des souches pures a été effectuée sur milieu solide MRS incliné. Après croissance à la température appropriée (30°C), les cultures ont été maintenues à 4°C et un repiquage a été fait toutes les 3 semaines pour les maintenir en vie (**Saidi *et al.*, 2002**)

1.3.2.3. Analyse physico-chimique du lait

1.3.2.3.1. Préparation du lait

Les étapes de préparation du lait sont résumées dans **la figure (03)**

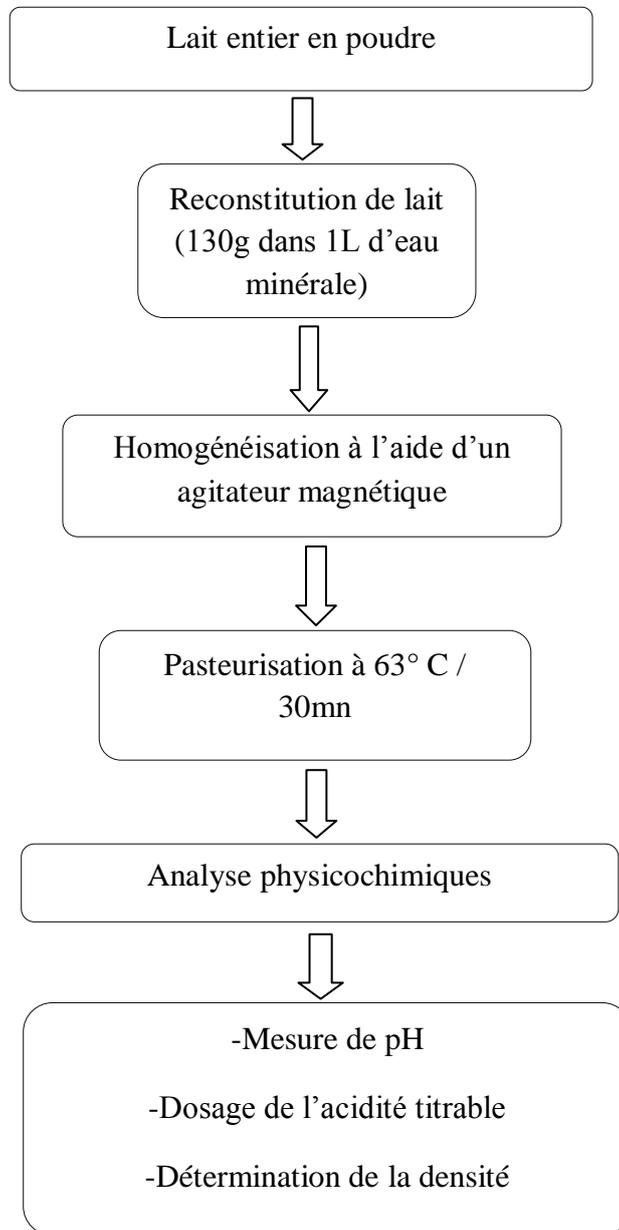


Figure 03 : préparation du lait

a. Mesure de pH➤ **Principe**

La mesure du pH du lait s'effectue à une température de 20°C à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné avec des solutions tampons (pH 7 et 4).

➤ **Mode opératoire**

D'après **Debouz *et al* (2014)**, la détermination du pH se fait comme suit :

- Mettre 10 ml du lait dans un bécher ;
- Plonger l'électrode du pH-mètre dans le bécher qui contient du lait
- Lire la valeur du pH qui s'affiche sur l'écran.

b. Détermination de la densité

La densité du lait est une grandeur sans dimension qui désigne le rapport entre la masse d'un volume donné de lait à 20°C et la masse du même volume d'eau (**Pointurier, 2003**).

➤ **Principe**

La détermination de la densité du lait est faite à l'aide d'un lactodensimètre à une température de 15°C.

➤ **Mode opératoire**

Selon **Pointurier, (2003)**, les étapes à suivre pour déterminer la densité sont :

- Verser le lait dans l'éprouvette tenue inclinée afin d'éviter la formation de mousse ou de bulles d'air,
- Remplir l'éprouvette jusqu'à un niveau tel que le volume restant soit inférieur à celui de la carène de lactodensimètre,
- Plonger doucement le lactodensimètre dans le lait en le maintenant dans l'axe de l'éprouvette en le retournant dans sa descente jusqu'au voisinage de sa position d'équilibre, Attendre trente secondes à une minute avant d'effectuer la lecture de la graduation, cette lecture étant effectuée à la partie supérieure du ménisque, lire la température.

➤ **Lecture du Lactodensimètre**

- Si la température du lait au moment de la mesure est supérieure à 15°C, augmenter la densité lue de 0.0002 par degré au-dessus de 15°C.
- Si la température du lait au moment de la mesure est inférieure à 15°C, diminuer la densité lue de 0.0002 par degré au au-dessus de 15°C.

c. Détermination de l'acidité titrable**➤ Principe**

L'acidité est déterminée par le dosage de l'acide lactique à l'aide de l'hydroxyde de sodium à 0,11 moles/l.

La présence de phénolphtaléine, comme indicateur coloré, indique la limite de la neutralisation par changement de couleur (rose pale). Cette acidité est exprimée en degré Dornic (°D) où : 1 ° D représente 0,1 g d'acide lactique dans un litre de lait (**Mathieu, 1998**).

➤ Mode opératoire

- Dans un bécher introduire 10 ml de lait prélevé à la pipette,
- Ajouter dans le bécher trois gouttes de l'indicateur phénolphtaléine,
- Titrer par la solution d'hydroxyde de potassium 0.11N jusqu'à virage au rose, facilement perceptible par comparaison avec un témoin constitué du même lait.

On considère que le virage est atteint lorsque la coloration rose persiste pendant une dizaine de secondes,

- Effectuer au moins deux déterminations sur le même échantillon préparé.

1.3.2.4. Activité enzymatique**1.3.2.4.1. Mesure du temps de floculation**

C'est le temps d'apparition des flocons visibles à l'œil nu (la taille minimale des agrégats micellaires observable à l'œil nu se situe autour de 200 μm) (**Ramet, 1997**)

La mesure du temps de floculation est faite soit à 32° C, soit à 35° C, avec des concentrations d'enzyme telles que la floculation visible sur la paroi du tube soit comprise entre 3 et 10 mn (**Alais, 1974**).

1.3.2.4.2. Détermination de l'activité coagulante

L'unité d'activité coagulante (U.A.C) ou l'unité présure est définie par la quantité d'enzyme contenue dans 1ml, qui peut coaguler 10 ml de lait en 100sec à 30°C (**Alais 1974**).

Où

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

V: volume du lait

V' Volume de l'extrait enzymatique

T : temps de floculation

Un volume de 10ml de lait est versé dans un tube à essai et porté à 30°C dans un bain marie. Au temps zéro, 1 ml de la solution enzymatique est ajouté et le chronomètre déclenché. Le tube immergé est maintenu incliné, de telle sorte que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du lait. Il est régulièrement animé d'un mouvement rotatif autour de son axe. Le lait forme ainsi un film mince et homogène. Au moment de la floculation, des petits flocons apparaissent au sein même de ce film.

1.3.2.4.3. Estimation de la 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, l'extrait enzymatique testé est dilué pour donner un temps de floculation entre 1 et 3 minutes (**Alais, 1974**).

La force ou l'unité soxhlet correspond au nombre d'unités de poids ou de volumes de lait coagulable en 40 min par une unité de poids ou de volume de préparation enzymatique à 35 °C et elle est calculée selon l'équation suivante:

$$Force = \frac{2400 \times V}{T \times V'}$$

Où

2400=40mn X 60 sec

V = volume du lait en ml

V'=volume de l'extrait enzymatique en ml

T= temps de floculation en secondes

1.3.2.4.4. Détermination du temps de prise

Le temps de prise est le point où apparaissent les premières gouttelettes du lactosérum sur la surface du gel, le coagulum devient rigide et ne coule plus sur les parois du tube (**Alais, 1974**).

➤ Mode opératoire

Un volume de 10ml de lait est versé dans un tube à essai maintenu à 30°C dans un bain marie, puis additionné de 1 ml de la solution enzymatique, le tube est laissé jusqu'à la solidification du gel et l'apparition des premières gouttelettes du sérum sur la surface du gel. Le temps écoulé représente le temps de prise.

1.3.2.5. Fabrication de fromage frais

Les étapes de fabrication du fromage frais sont les suivants :

a. Préparation des pré-cultures

Selon **Kihal et al.,(2009)** , la préparation de la prés culture se réalise comme suit :

Dans deux tubes contenant 10 ml de lait écrémé stérile, on inocule les deux souches standardisées (**voir annexe 4**) séparément dans deux tubes :

Dans l'un on inocule *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar.*diacetylactis* , et dans l'autre on inocule *Leuconostoc mesenteroides* subsp.*mesenteroides*, puis on incube les deux tubes à 30°C pendant 24 heures

Une fois la pré-culture est préparée on met les deux souches dans un cristalliseur stérile contenant 480 ml du lait entier préparé préalablement et chauffé jusqu'à 30°C dans un Bain marie.

L'opération se fait deux fois, l'une pour le suivie de la cinétique d'acidification et de croissance des bactéries, l'autre pour la fabrication du fromage.

b. emprésurage

Deux heures après l'inoculation des ferments lactiques, on ajoute 1 ml d'une solution de chymosine préparé préalablement à une concentration de 1g/100ml.

c. Coagulation

Le laitensemencé avec les levains est incubé à 30°C pendant 24h, (**photo01**)

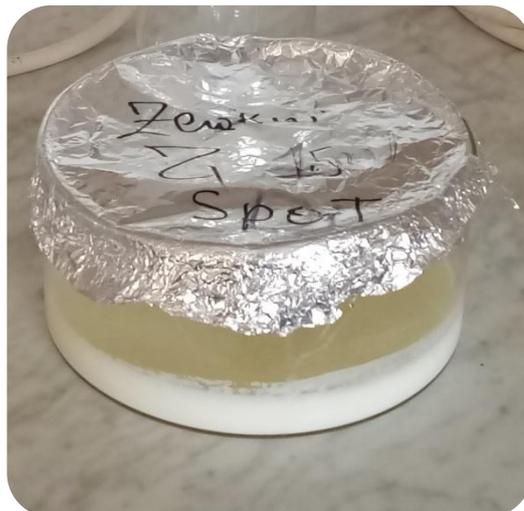


Photo 01 : Coagulation du lait

d. Tranchage

Nous procédons au tranchage vertical, pour avoir des cubes de 5cm dans le but de faciliter le phénomène de la synérèse. Il est effectué par un couteau. **(Photo 02)**



Photo 02 : Tranchage du caillé

e. Brassage

Consiste à agiter modérément dans le lactosérum les grains de caillé obtenus après tranchage, afin de maintenir libre les surfaces d'exsudation formé. **(Photo 03)**



Photo 03: Brassage du caillé

f. Égouttage

C'est l'élimination progressive de lactosérum qui s'accompagne d'une rétraction et d'un durcissement corrélatif du gel. On utilise un tissu qui serve à l'élimination de lactosérum.

(Photo 04)



Photo 04 : Égouttage du caillé

g. Salage

Le salage à été effectué en saumure (500 ml d'eau distillée + 10 g de sel de cuisine) pendant 20 min, suivie par un deuxième égouttage (**Moulay, 2014**). **(photo 05)**



Photo 05 : salage en saumure

h. Moulage

Le moulage est la mise en forme du caillé dans des moules de différents formats. Dans notre cas on a utilisé des carrés simples. (**photo 06**)



Photo 06: moulage de fromage

i. Conservation

On conserve le fromage frais à température de 4°C pendant 48h puis on procède aux analyses physico-chimiques et organoleptiques.

1.3.2.6. Étude de la cinétique des souches

a. Étude de la cinétique d'acidification

➤ principe

Selon la méthode décrite par **Kihal et al., (1996)**, l'évaluation de l'acidité produite par les souches, sur milieu solide et sur milieu naturel (lait), est réalisée par titrimétrie et par pH mètre.

Les souches testées produisant de l'acide lactique sont exprimées en degrés Dornic.

➤ Mode opératoire

Chaque souche estensemencée dans 10ml de lait écrémé stérile. L'incubation se fait de 18 à 24 heures jusqu'à coagulation du lait (on note le temps de coagulation).

Le lait écrémé coagulé est ajouté dans 480 ml de lait entier et on homogénéise. Le mélange est réparti dans des tubes stériles à raison de 10 ml/tube. On dose le pH et la quantité d'acide lactique produit, ceci après incubation à différents temps (0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h...24 h).

b. Étude de la cinétique de croissance➤ **mode opératoire**

Le suivie de la cinétique de croissance a été réalisé par la technique des micro-spots, pour chaque tube à essai, des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-6} ont été préparées. Seul 10 μ L de chaque dilution bactérienne (spot) est déposée sur une surface de gélose MRS déjà gélifiée.

Chaque spot est reproduit six fois. Après séchage des micro-spots, la boîte de pétri est ensuite retournée puis incubée à l'étuve à 30°C durant 24h. Les micro-spots contenant 3 à 60 bactéries sont dénombrés (**Bulard, 2012**).

➤ **Expression de résultats**

Selon **Joffin et Leyral (2006)**, les résultats sont exprimés selon la relation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{(n1 + 0.1n2)d}$$

N : nombre d'unité formant colonie (UFC)

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 la quelle les premiers dénombrements ont été retenus.

1.3.2.7. Analyses physico-chimiques du fromage frais**a. Mesure du pH**

Le principe consiste à la mesure directe du pH à l'aide d'un pH-mètre, l'électrode de ce dernier et introduit dans la solution mère (étant 10g de fromage dilué dans 70 ml d'eau distillée), la valeur du pH est lue directement sur l'échelle graduée du pH mètre (**Quasem et al., 2009**).

b. Mesure de l'acidité titrable

Déterminée selon **Mathieu, (1998)**, consiste d'ajouter une solution de soude (1/9N) par titration à 10ml de solution de fromage (soit 4g de fromage préparé dilué dans 40 ml d'eau distillée), additionné de trois gouttes de phénolphtaléine indicateur coloré qui passe de l'incolore en milieu acide au rose en milieu alcalin. On effectue la lecture à partir de la quantité de soude utilisée dans le titrage. L'acidité s'exprime en degré Dornic (°D).

1.3.2.8. Rendement fromager

Le rendement fromager correspond à la quantité de fromage que L'on peut obtenir avec une quantité fixée de lait (**Bank *et al*, 1984**).

$$R = \frac{\text{Poids du fromage}}{\text{masse de lait utilisé}} \times 100$$

1.3.2.8.Évaluation sensorielle du fromage frais

L'objectif de cette analyse consiste à donner le profil sensoriel global de notre fromage frais fabriqué avec un juré dégustateur. Cette analyse décrit les caractéristiques sensorielles du fromage soit l'aspect et la texture, l'odeur, l'arôme, l'arrière-goût et la persistance du goût du fromage.

Nous avons composé des jurys de 08 sujets (des enseignants, des ingénieurs de laboratoire et des étudiants).

Plusieurs facteurs ont été pris en considération avant l'évaluation afin d'obtenir des performances optimales de la part des sujets:

- Les sujets ne souffrent d'aucune maladie,
- Les sujets sont informés d'éviter l'utilisation des produits fortement odorants tels que parfums,
- Les sujets ne peuvent ni fumer, ni manger, ni boire autre chose que de l'eau pendant la dernière demi-heure précédant l'évaluation.

Les dégustateurs ont évalué les attributs: l'aspect, la couleur, l'odeur, le goût et la texture, en conférant le signe (**X**) sur le caractère trouvé dans la fiche de dégustation.

Déroulement de l'essai

L'évaluation a été faite au niveau d'une salle au laboratoire d'analyse microbiologique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Ibn Khaldoun-Tiaret.

Résultats et discussion

2.1. Ré-identification des souches

L'étude de la caractérisation des souches a été réalisée par plusieurs étapes successives, les résultats de la ré-identification des souches sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau (02) : Ré-identification des souches

Tests Souches	Aspect des colonies	Gram	Morphologie cellulaire et arrangement	catalase	Type fermentaire
<i>Lactococcus diacetylactis</i> (SD17)	Colonies petites, rondes ou lenticulaire de couleur blanche avec un contour régulier	Positive	Cocci, diplo, courtes chaînettes	Négative	Homofermentaires
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (19D)					Hétérofermentaires

2.1.1. Étude morphologique

a. Tests macroscopiques

L'observation macroscopique des souches (*Lactococcus lactis* subsp.*lactis* biovar.*diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp.*mesenteroides*) nous a permis de décrire les colonies obtenues sur milieu solide (de petit taille, couleur blanchâtre et de forme rond ou lenticulaire) (**Photo 08**).

En milieu liquide on a remarqué la présence de trouble fumeux surmonté d'une zone claire. Il s'accroît au fur et à mesure de la purification des souches, ceci traduit le caractère micro-aérophile des bactéries lactiques (**Photo 07**).

Nos résultats concordent à ceux trouvés par **Hariri et al.(2009)** ; **Ismail et al.(2016)**

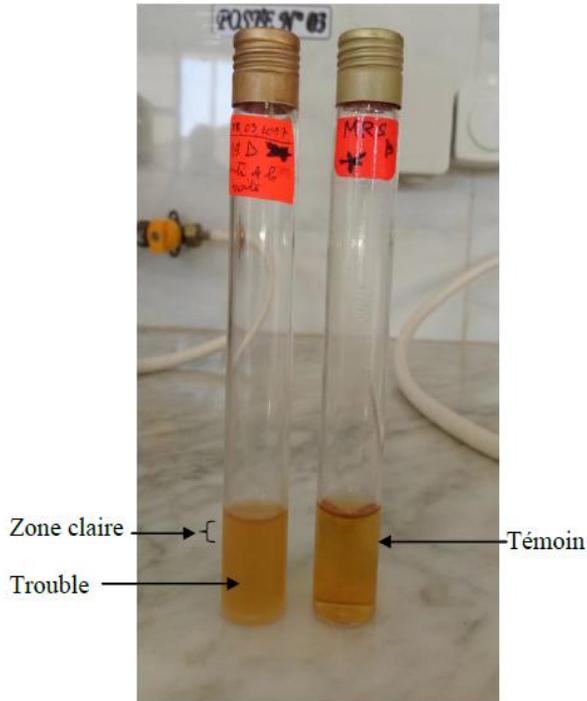


Photo 07 : Aspect de culture pure des lactocoques, en milieu MRS liquide, la culture se développe mieux en profondeur ou la pression de l'Oxygène est faible.



Photo 08: Aspect des colonies des bactéries lactocoques obtenues après 24h d'incubation à 30°C sur milieu MRS solide.

b. Tests microscopiques

L'observation microscopique des souches étudiés a montré que sont tous Gram positif se présentent en forme de coques disposées, en diplocoques et en courtes chaînettes (**Photo 09**).

Nos résultats sont identiques à ceux trouvées par ; **Badis et al.(2005)** et **Kihal et al.(2009)** **Moulay et al.(2013)**

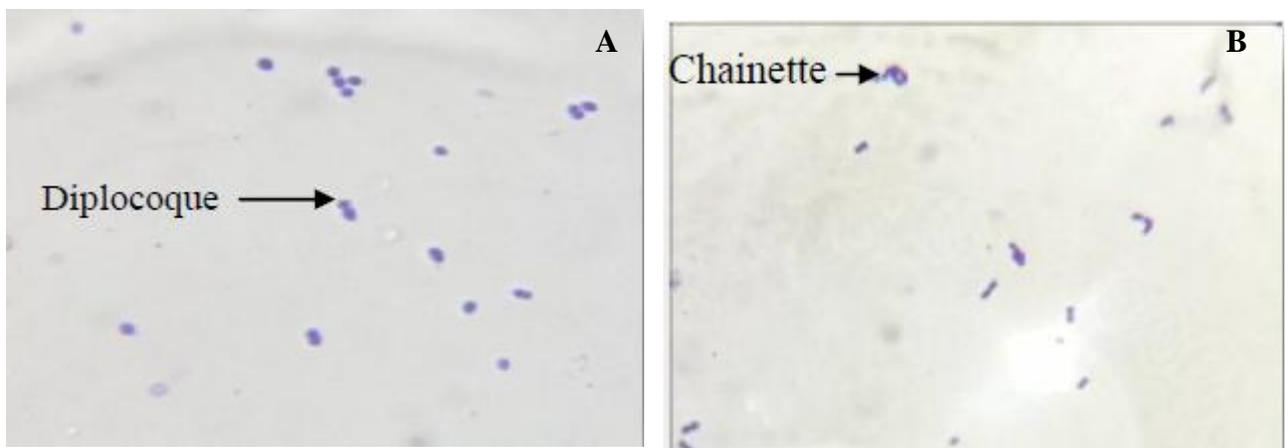


Photo 09: Aspect microscopique et arrangement des isolats après coloration de Gram (X100)

A. Lactocoque B. Leuconostoc

2.1.2. Étude biochimiques

a. Test de catalase

D'après les résultats trouvés, nous observons l'absence des bulles d'air après le dépôt de l'eau oxygénée sur la colonie cible, cela confirme que nos souches sont des catalases négatives, qui sont conformes aux résultats trouvés par **Carr *et al.*, (2002)**, **Guessas et Kihal (2004)**, **Ismail *et al.*, (2016)**.



Photo 10 : Test de catalase

b. Type fermentaire

Les résultats obtenus du type fermentaire sont illustrés dans la (**photo 11**), ce test est effectué pour différencier entre les souches hétérofermentaires et homofermentaires, et de les classées.

Les souches hétérofermentaires vont produire, en plus de l'acide lactique, l'acide acétique et le CO₂. La production de gaz se manifeste par le flottement de la cloche qui est vider du milieu (**Kheddid *et al.*, 2006**).

Nos résultats ont montré que la souche de *Leuconostoc mesenteroides* (**19D**) a produit du gaz en présence de glucose (hétérofermentaire), en revanche, les souches de *Lactococcus diacetylactis* (**SD17**) sont incapables de le produire (homofermentaires).

Ces résultats sont en accord avec ceux de : **Badis *et al.*,(2005)** ; **Ismail *et al.*,(2016)**

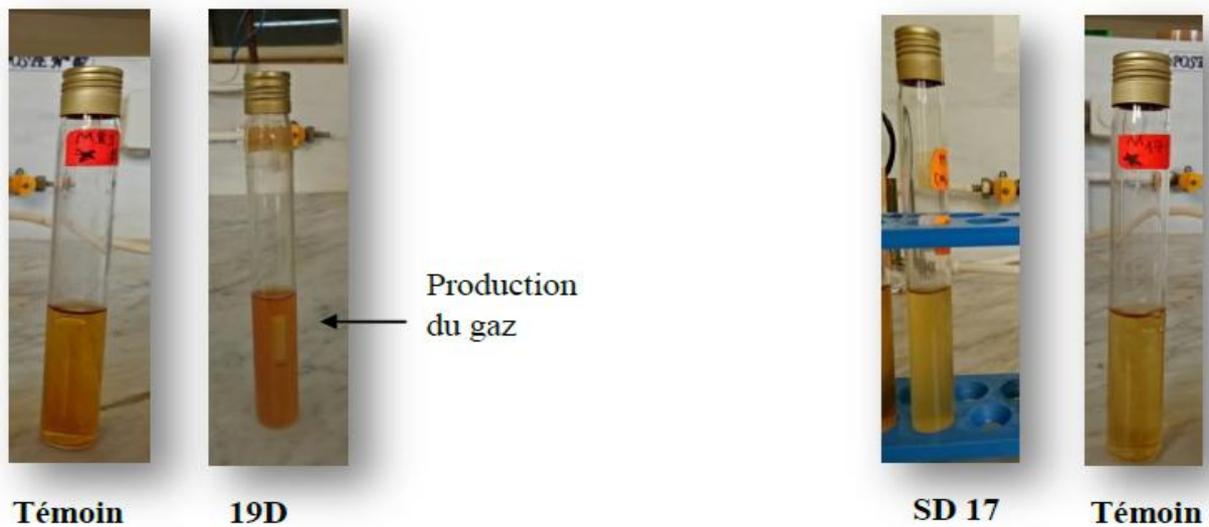


Photo 11 : Test de type fermentaires des souches : *Lactococcus diacetylactis* (SD17) et *Leuconostoc mesenteroides* (19D)

2.2. Analyses physico-chimiques du lait

Les résultats des analyses physico-chimiques du lait sont consignés dans **le tableau 03**

Tableau 03 : Caractéristiques physico-chimiques du lait entier

Paramètres	Valeur
Acidité	19
Densité	1.030
pH	6.64

2.2.1. pH

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que la valeur du pH est égale à 6,64, qui est dans la fourchette donnée par **Sina (1992)** ; **Douik et al. (2003)**, qui ont trouvé des valeurs de pH qui vont de 6,69 à 6,79, et entre 6,60 et 6,91 respectivement.

D'après **Siboukeur et Siboukeur, (2012)**, la valeur du pH est dépendante de la teneur en citrates et en caséines, sels minéraux et en ions ainsi de l'état sanitaire de la mamelle, le pH pourrait être affecté par l'alimentation et la disponibilité de l'eau.

2.2.2. Acidité titrable

D'après les résultats illustrés dans le **tableau (03)**, l'acidité du lait est de l'ordre de 19, notre résultat coïncide au résultat d'**Esseghir, (2003)**, l'acidité du lait normal doit être comprise entre 19-23°D.

D'après **Labioui, 2009** le pH et l'acidité dépendent de la teneur en caséine, en sels minéraux et on ions, mais aussi des conditions hygiéniques lors de la traite, de la flore microbienne totale et de son activité métabolique, peuvent être liées au climat, au stade de lactation, à la saison et a la conduite d'élevage notamment l'alimentation et l'apport hydrique.

2.2.3. Densité

En comparant nos résultats avec les valeurs trouvées par **Bonnefoye et al.,(2002)** qui se situe dans l'intervalle (1,028 à 1,032). La valeur obtenue de la densité pour le lait étudié soit 1.030.

D'après **Mathieu, (1998)**, la densité du lait et le rapport des masses d'un même volume du lait et d'eau à 20°C.

Rodier, (1996), montre que la densité dépend directement de la teneur en matière sèche qui est liée fortement à la fréquence de l'abreuvement (si elle est trop élevée, ceci explique que le lait est écrémé), et est inversement proportionnelle au taux de matière grasse.

2.3. Activité enzymatique

Les résultats de la caractérisation de l'enzyme sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 04 : Caractérisation de l'enzyme utilisé

Paramètres	Valeur
Temps de floculation (sec) à 30°C	350
Temps de coagulation (mn)	30
Activité coagulante (unité/ml)	17.15
Force de coagulation	1/4117

2.3.1. Mesure du temps de floculation

Selon **Eck(2007)**, le temps de floculation est le temps de l'apparition des premiers flocons visible à l'œil nu après le contact entre le substrat et la solution enzymatique.

Notre résultat montre qu'un ml de la solution enzymatique, provoque la formation des premiers flocons d'environ 350 sec.

Au cours de la phase enzymatique la présure attaque le composant stabilisant de la micelle **Brule et Lenoir, (1987)**.

Selon **St-Gelais et Tirard Collet (2002)**, Les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes. Les ions calcium s'uniraient à la partie chargée négativement des micelles, diminuant ainsi les répulsions électrostatiques aux quelles elles sont soumis et favoriseraient ainsi leur agrégation.

2.3.2. Détermination de l'activité coagulante

L'unité de l'activité coagulante (U.A.C) est la quantité d'enzyme contenue dans 1 ml de la solution enzymatique, qui peut coaguler 10 ml de lait en 100sec à 30°C, est de 17.15 unité/ml.

Par comparaison, notre résultat est très loin à la valeur obtenue par **Boughellout,(2007)**, qui est de 2,42 unité/ml à 30°C.

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

2.3.3. Détermination de la force coagulante

La force coagulante exprimée dans notre résultat est de 1/4117, cette valeur est différente à celui obtenue par **Adoui (2007)** estimé à 1/2579 et proche au résultats soutirés par **Nouani et al.,(2009)** évalué à 1/3200.

2.3.4. Détermination du temps de prise

Pour la coagulation présure, le temps de prise représente généralement environ le double du temps de floculation ; ainsi pour un temps de coagulation compris entre 12 et 15 min, le temps de prise est compris entre 25 et 30 min (**FAO, 1990**).

Notre résultat montre que Le temps de prise obtenue est de 30 min.

2.4. Résultats de la cinétique d'acidification et de croissance

2.4.1. Cinétique d'acidité des souches

L'une des étapes cruciales de la fabrication fromagère est la coagulation du lait, en effet la cinétique d'acidification va déterminer les qualités du caillé et donc influencer les caractéristiques du produit fini (texture, couleur,...), les levains lactiques sont essentiellement sélectionnés sur la base de leurs propriétés acidifiantes.

Les résultats illustrés en graphes dans (**figures 04 et 05**) représentent l'évolution du pH et de l'acidité dornic de la souche *Leuconostoc mesenteroides* (**19D**) et *lactococcus diacetylactis* (**SD17**) en culture mixte.

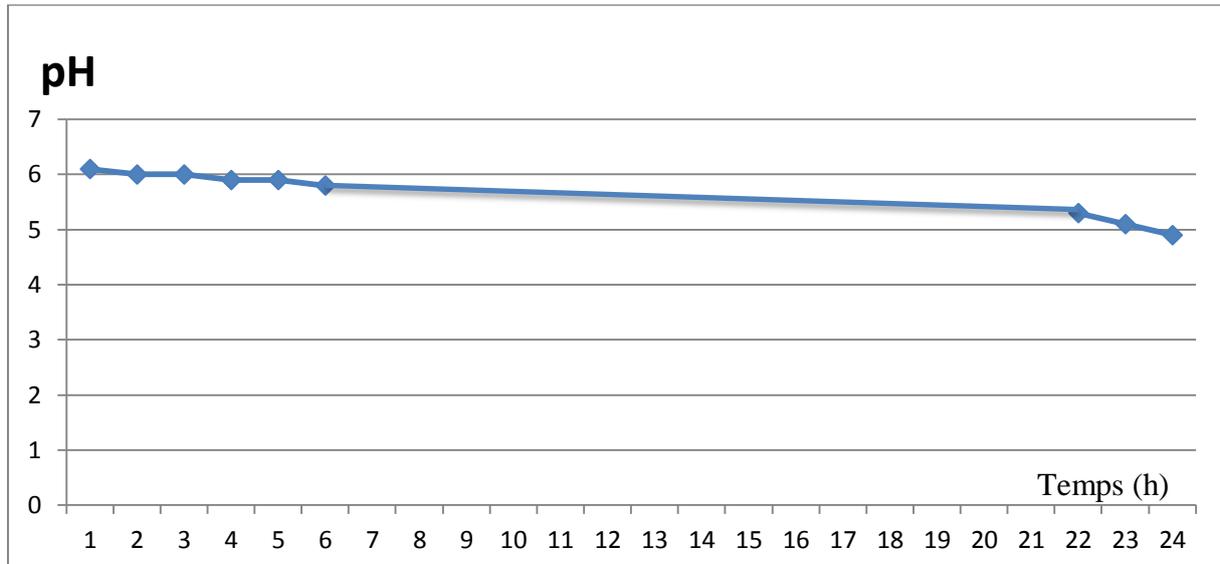


Figure 04 : Cinétique d'évolution de pH de (SD17 ,19D) cultivées sur milieu lait à 30°C

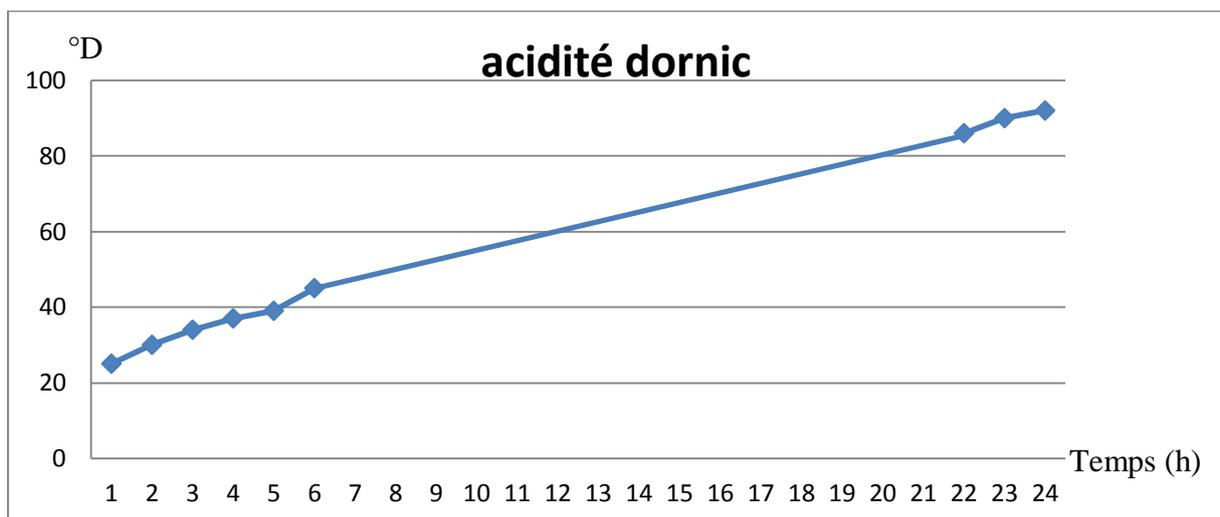


Figure 05 : Cinétique d'évolution de l'acidité dornic de (SD17 ,19D) cultivées sur milieu lait à 30°C

D'après **Moulay *et al.*, (2013)**, la cinétique d'acidification du lait est essentiellement due à la production de l'acide lactique qui varie selon les souches. Il existe une relation étroite entre le pH et le degré Dornic ; quand le pH diminue la quantité d'acide lactique produite augmente.

D'après la courbe d'évolution du pH et de l'acidité Dornic, nous constatons que l'acidification du lait a été lente dans les 6 premières heures de fermentation, arrivé à 5.8, en parallèle le degré de l'acidité Dornic atteindre 45°D.

Après 22h d'incubation la valeur du pH diminue jusqu'à 5,3 tandis que le taux d'acidité augmente vers 86°D. Au bout de 24h d'incubation, le pH atteint une valeur maximale de 4,9 et l'acidité Dornic arrive à 92°D.

On constate qu'à la fin de coagulation, notre résultat du pH (pH= 4.9) est proche de ce qui a été trouvé par **Roux,(1994)**, qui est 4,5.

En parallèle la valeur de l'acidité dornic final (92°D) est élevée par rapport au résultat obtenu par **Moulay(2014)**, qui est 77°D.

D'après **Cailliez-Grimal et al., (2007)**, l'activité acidifiante des bactéries lactiques conditionne, pour une grande part, l'aptitude du lait à la coagulation, l'aptitude du caillé à l'égouttage et la composition finale du fromage.

2.4.2. Suivi de la cinétique de croissance

Le suivi de la croissance est réalisé par dénombrement sur milieu MRS (technique des micro-spots) (**Photo 12**).

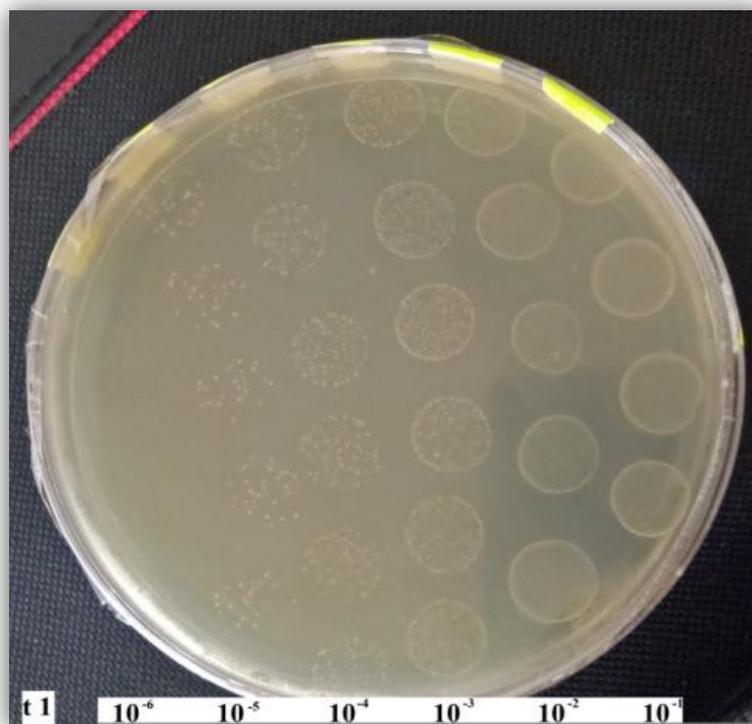


Photo 12 : Aspect des colonies sur milieu MRS solide (technique des micro-spots)

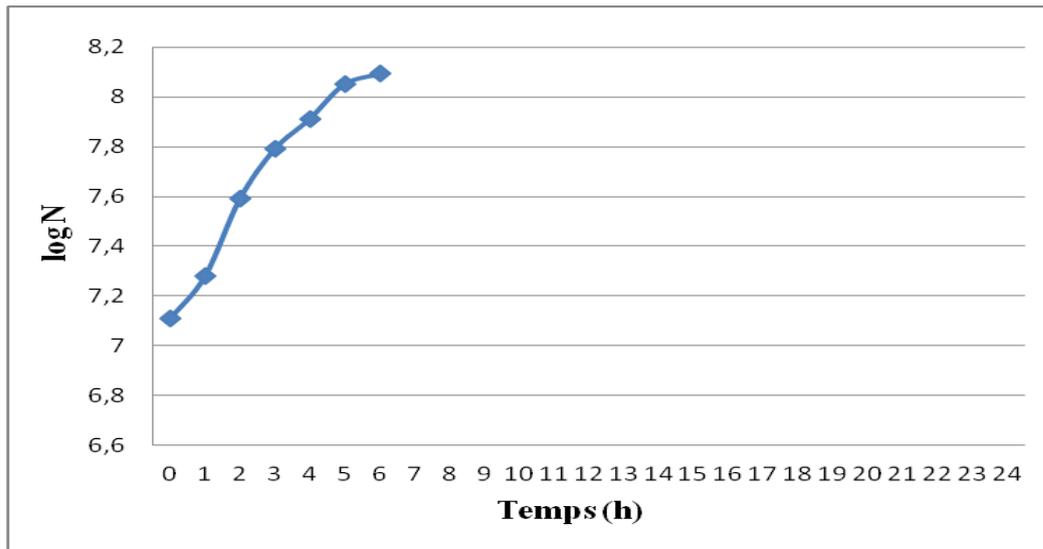


Figure 06 : Cinétique de croissance des souches *Leuconostoc* et *Lactococcus* dans le lait à 30° C.

D'après la **figure (06)**, l'évolution de la croissance des bactéries lactiques se déroule en une phase, dite la phase exponentielle, ou le nombre des cellules qui sont exprimées en log UFC/ml va augmenter en fonction du temps.

On remarque l'absence de la phase de latence qui est expliquée par la préadaptation des souches au lait écrémé durant 24 h d'incubation.

La cinétique d'apparition des produits de fermentation suit celle de la croissance, avec 9.2 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 4,9.

D'après **Boudjema et al (2009)**, de façon générale, le lactose est converti en acide lactique par la voie d'EMBDEN MEYERHOF qui forme deux molécules de lactate par molécule de lactose consommé.

A l'aide de β -galactosidase, le lactose est scindé en galactose et glucose pour donner par la suite le pyruvate, ce dernier est transformé en acide lactique et énergie sous forme d'ATP.

Durant la phase exponentielle ou la croissance et la production sont assez importantes, la bactérie exige beaucoup d'ATP pour assurer la synthèse et la production.

2.5. Analyse physicochimique du fromage

Les valeurs des paramètres physico-chimiques (pH, acidité titrable) du fromage après 48 h de conservation sont mentionnées dans **le tableau(05)**.

L'observation des valeurs expérimentales montre que le pH du fromage frais préparé est un pH acide (4,9) et une acidité relativement élevée (126°), suggère que l'activité microbienne lactique est assez importante.

Nos valeurs sont concordantes parfaitement avec les résultats illustrés par **Rhiat et al.,(2011)**.

L'augmentation de l'acidité est due au nombre de micro-organismes présents dans ce fromage d'une part, et d'autre part à la prolifération de ces micro-organismes qui entraînent par leurs métabolismes une production élevée de l'acide lactique, elle fait baisser le pH (**Alamir, 2002**).

Tableau 05 : Analyses physico-chimiques du fromage

Paramètre	pH	Acidité titrable
valeur	4.9	126°D

2.6.Rendement fromager

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 du lait donné (**Eck et Gillis, 1997**).

Le rendement obtenu de notre fromage frais était de 20.4%.

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.

2.7. Résultats des analyses organoleptiques du fromage frais fabriqué

Les résultats obtenus sont rassemblé dans le (**tableau 06**) qui indique le pourcentage de chaque caractère.

Tableau 06: Évaluation sensorielle du fromage (test de dégustation)

Caractère étudiée		Fromage
Couleur	Jaunâtre	0%
	Jaune crème	0%
	Crème claire	25%
	Blanchâtre	75 %
Aspect	Sec	0%
	Hydratant	45%
	Normal	55%
Texture	Ferme	0%
	Granulée	12.5%
	souple	62.5%
	Onctueuse	25 %
Gout	Très bon	87.5%
	Bon	12.5%
	Moyen	0%
	Acide	0%
	Amère	0%
	Rance	0%
	Sale	0%
Odeur	Lait cru	0%
	Beurre	0%
	Fromage	100%
	L'ben	0%
Le fromage est :	Bon	

A travers les notes attribuées aux différents descripteurs, nous constatons que les membres du panel de dégustation décrivent le fromage issu de la coagulation mixte comme suit : un fromage ayant une couleur blanchâtre, il à une texture souple, possède un aspect normal, avec une odeur du fromage, son goût est bon.



Photo 13 : Fromage frais préparé

Conclusion

Conclusion

Cette étude nous a permis de connaître les étapes essentielles de la préparation de fromage frais par l'addition de la chymosine et les levains lactiques (*Leuconostoc* et *Lactococcus*) au lait entier.

Les levains lactiques jouent un rôle central dans le traitement de lait pour obtenir un fromage par acidification rapide .la préservation du lait et la formation de saveur spécifique.

Les résultats obtenu lors de cet étude confirme que les ferments lactique ré-identifier sont tous Gram positif sous formes des coques associées en diplocoques ou en courtes chainettes, catalases négative, homofermentaire pour les *lactocoques* et hétérofermentaire pour les *leuconostocs* .

Les analyses physico-chimiques du lait entier utilisé pour la fabrication du fromage frais par coagulation mixte est acceptable pour les critères : acidité (19°D), pH (6.64), densité (1.030)

L'étude de l'activité enzymatique sur la chymosine montre que notre enzyme possède un temps de floculation élevé (350 secs), une activité coagulante (17.15 unité/ml) et une force coagulante (1/4117).

Les résultats obtenus du fromage frais montrent que durant l'évolution de la croissance, l'acidité dornic augmente proportionnellement avec l'augmentation du nombre des cellules alors que l'évolution du pH est inversement proportionnelle à l'évolution du nombre de cellules

La plupart des personnes interrogées lors de l'évaluation sensorielle estiment que notre fromage est de bonne qualité organoleptique, il se distingue par une couleur blanchâtre, une odeur de fromage, un aspect normal et une saveur bonne.

- **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.
- **Alais C. (1974)**. Science du lait principes des techniques laitières. 3ème édition 807p
- **Alamir H., (2002)**. Étude de la flore lactique d'un fromage traditionnel obtenu par coagulation par la fleur de cardon sauvage. Thèse de fin d'étude pour l'obtention d'un diplôme de magister en science alimentaires. Institut national agronomique d'Elharrach. Alger.
- **Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M., 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 D., Tamime A Y., (1984)**. A comparison of cheese yields and cheese making efficiency using seasonal and standardized milk. Dairy technology. 37: 38- 88.
- **Boudjema K ., Fazouane-Naimi F., Hellal A., Mechakra. (2009)** : optimisation et modèle de production d'acide lactique par streptococcus thermophilus sur lactosérum ; Sciences & Technologie C-N29 juin, pp.80-90
- **Bonnefoye C., Guillet F., Leyral G. et Verne-Bourdais E. (2002)**. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Edition Biosciences et Techniques. 138p.
- **Boughellout H. (2007)**. Coagulation du lait par la pepsine du poulet. Mémoire de Magistère. Université MENTOURI : Institu de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires. Constantine. P55. Proteolytic Enzymes. ED.,G.E.Perlmann and L. Lorand,Acad. Press Inc., New York, V .19, p.347-358, 1042p
- **Bourgeois C-M et Larpent J-P., (1996)** : Microbiologie alimentaire. Aliments fermentés et fermentation alimentaires, Ed Tech et Doc, Lavoisier, 2èmeédition, Tome 2. Paris : 523p.
- **Bourgeois C.M., Mesclé J.F. et Zuca J. (1996)**. Lait et les produits laitiers non fermentés, Microbiologie alimentaires. Tome 1, aspect micro biologique de la sécurité et de la qualité des aliments.
- **Brule et Lenoir. (1987)**. Coagulation du lait In : fromage. Ed : Tec et Doc, Lavoisier et CNIEL.p.509-541.
- **Brule G., Lenoir J., et Remeuf., (1997)**. La micelle de caséine et la coagulation du lait In Le fromage. Ed., Eck A., 3ème édition Tec et DOC Lavoisier, Paris, pp. 7-41.

Références bibliographiques

- **Bulard E. (2012).** L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire. Thèse de Doctorat. Université Paris-sud, Paris.
- **Cailliez-Grimal C., Edima H.C., Rvol-Junelles A.M. et Millière J.B. (2007).** Carnobacterium maltaromaticum: the only Carnobacterium species in French ripened soft cheeses as revealed by polymerase chain reaction detection. Journal of Dairy Science. 90: 1133-1138.
- **Carole L., Vignola., (2002).** Science et Technologie du lait. 598p
- **Carr F J., Chill D. et Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria. Critical Review in Microbiol. 20. 281-370.
- **Debouz A., Guerguer L., Hamid A. et Hadj Seyd, A. (2014).** Etude comparative de la qualité physico-chimique et microbiologique du lait de vache et du lait camelin dans la wilaya de Gardaia. Elwahat pour les recherches et les Études, 7 (02) : 10-17.
- **Dortu C et Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement.1(13):143-154.
- **Douik R., Ettriqui A. et Zrelli S., (2003).** Relation entre le test à l'alcool et la qualité du lait à la réception. Microb. Hyg. Alim.,15(42):19-26
- **Eck A., Gillis J.C., (1997).** Le Fromage, De la science à l'assurance-qualité ; 3e éd- Paris, 891p.
- **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.
- **Forbes B. A. , D. F. Sahn and A .S. Weissfeld. (1998).** Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 10th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
- **Fredot E. (2009).** Lait et produits laitiers. In : Connaissance des aliments. Ed Tech. Doc. Lavoisier (Paris). p 9 - 65.
- **Gastaldi-bouabid E., (1994).** Étude de l'évolution des micelles de caséine au cours de l'acidification : mise en évidence d'un état de transition entre pH 5.5 et pH 5.0 – Thèse Doctorat Académie de Montpellier. Université de Montpellier II.
- **Gelais-st D., Tirard-Collet P., Belonger G., Couture R. et Drapeau R. (2002).** Fromage. In: Vignola C. L. Science et Technologie du lait, transformation du lait. 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
- **Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Djilali B. (2009).** Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environ. Congrès international BIOMEDI Marrakech* : 37-55
- **Henri G., Bénédicte C.C., Jean-Yves G., Joffin J.N. et Leyral G. (2006).** Microbiologie techniques, *Doc*, Bordeaux, pp : 75- 239
- **Horne D.S. (2002).** Caseins, micellar structure. In ROGINSKI H., FUQUAY J. et FOX P.F.(Eds), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1902-1909). London: Academic Press.
- **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.
- **Jeantet R., Croguennec., Schuck P. et Brule G., (2006).** Science des aliments. Volume 2, Technologies des produits alimentaires, 456p
- **Khedid K., Faid M., Mokhtari A., Soulaymani A et Zinedine A. (2006).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol. Res.* 10 : 10-16.
- **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.
- **Labioui H., Elmoualdi L., Benzakour A., Yachioui M.E.L., Berny E., et Ouhssine M., (2009).** Etude physicochimique et microbiologique de laits crus, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. (148): 7-16.
- **Luquet F.M. et Corrieu G. (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. *Edit. Tech. Doc. Lavoisier* (Paris). p. 343-408.
- **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.

Références bibliographiques

- **Mathieu J. (1998).** Initiation à la physicochimie du lait, guide technologique des industries agroalimentaire. Edition : Tec et Doc Lavoisier. Vol 220.
- **Mietton B.M., Desmazeaud H. Roissart et Weber., (1994).** Transformation du lait en fromage , Bactéries lactiques, vol.2, Chap.IV, 3è édition, Lorica, 133p.
- **Mietton B. (1995).** Incidence de la composition des fromages au démoulage et des paramètres d'environnement sur l'activité des agents de l'affinage. Revue des ENIL, 189 pages.
- **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. (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 : p125.
- **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 (*Cynarascolymus*) and from the fig tree latex (*ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J. Food Technol.*, 7:20-29.
- **Pierre S ., (2008).** Procédés de transformation fromagère. *Techniques de l'ingénieur*, traité agroalimentaire f 6 305-1
- **Pointurier H. (2003).** La gestion matière dans l'industrie laitière, Tec et Doc, Lavoisier, France: 64 (388 pages).
- **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, 3è ed., Technique et documentation Lavoisier, p.101-107, 539p.
- **Z. et Ouhssine M. (2011).** Étude bactériologique comparative des fromages frais marocains commercialisés (Mahlabats) et des fromages fabriqués au laboratoire. *Afrique Science*. 7(3): 108 – 112.
- **Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Prevost H. et Kihal M. (2002).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Alg.Reg. Arides*. 1 :1-11

Références bibliographiques

- **Siboukeur A. et Siboukeur O. (2012).** Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du lait de chamelle collecté localement en comparaison avec le lait bovin. *Annales des Sciences et Technologie*. 4(2): 102-107.
- **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.
- **St-Gelais d. et Tirard-c. J. (2002).** Fromage In : sciences et technologie du lait. Transformation du lait. Ed : ISBN.Canada. p 345
- **Snouci, M.M. Abdeloui, A et Eddine, D. (2010).** Méthodes et techniques en bactériologie : p 60.
- **Vignola C. (2002).** Sciences et technologies du lait, transformation de lait. Ecole polytechnique de Montréal, 599p.
- **Veisseyre R. (1979).** Technologie du lait. 3^{ème} édition Maison Rustique, 714

ANNEXES

ANNEXE 01. Composition des milieux de culture et solutions (milieu M17)

Bouillon M17 (LARPENT et al., 1997)

Constituants	Quantité en g/l
• Tryptone	2,50 g
• Extrait de viande	5,00 g
• Extrait autolytique de levure	2,50 g
• Peptone pepsique de viande	2,50 g
• Peptone papainique de soja	5,00 g
• Lactose	5,00 g
• Glycérophosphate de sodium	19,00 g
• Acide ascorbique	0,50 g
• Sulfate de magnésium	0,25 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,1 \pm 0,2$.

Gélose M17

Constituants	Quantité en g/l
• Peptone de soja	5,00 g
• Peptone de viande	2,50 g
• Peptone de caséine	2,50 g
• Extrait de levure	2,50 g
• Extrait de viande	5,00 g
• Lactose	5,00 g
• Acide ascorbique	0,50 g
• Glycérophosphate de sodium	19,00 g
• Sulfate de magnésium	0,25 g
• Agar	15,00 g
• Eau distillée	1000 ml

Le milieu est stérilisé 20 minutes à 110°C.

ANNEXE 02. Composition des milieux de culture et solutions (milieu MRS)

Gélose MRS (pH 6.5)

Constituants	Quantité en g/l
• Peptone	10 g
• Extrait de viande	10 g
• Extrait de levure	5 g
• Glucose	20 g
• Tween	1ml
• Phosphate bipotassique	2 g
• Acétate de sodium	5 g
• Citrate d'ammonium	2 g
• Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	0.2 g
• Sulfate de manganèse, 4 H ₂ O	0.5 g
• Agar	15 g
• Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

Bouillon MRS

Constituants	Quantité en g/l
• Peptone	10,00 g
• Extrait de viande	8,00 g
• Extrait de levure	4,00 g
• Glucose	20,00 g
• Acétate de sodium trihydraté	5,00 g
• Citrate d'ammonium	2,00 g
• Tween 80	1,00 ml
• Hydrogénophosphate de potassium	2,00 g
• Sulfate de magnésium heptahydraté	0,20 g
• Sulfate de manganèse tétrahydraté	0.05g

pH=6.5±0.2 à 37°C

Autoclavage : 121°C /15min

ANNEXE 03. 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+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

ANNEXE 04. Standardisation des souches

Les standards McFarland sont employées pour standardiser le nombre approximatif de bactéries dans une suspension liquide en comparant la turbidité de la suspension d'essai à celle du standard de McFarland. Ces derniers sont préparés par ajout d'acide sulfurique à une solution aqueuse de chlorure de baryum, ce qui entraîne la formation d'un précipité de sulfate de baryum en suspension.

Le standard McFarland 5.0 correspond approximativement à 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 McFarland 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 Farland

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

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



1. Lait entier utilisé (Celia)

ANNEXE 05. Matériel et méthodes



2. Chymosine en poudre



3. Conservation des souches à court terme



4. Mesure de la DO par le spectrophotomètre



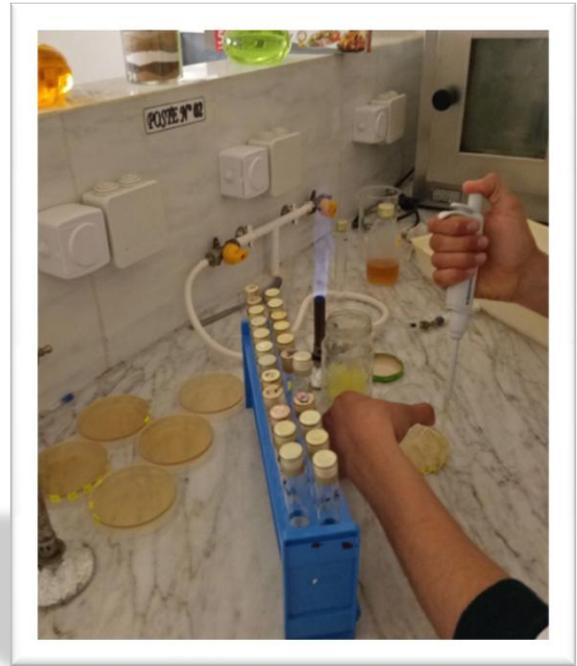
5. Mesure de l'acidité titrable



6. Mesure de la densité



7. Mesure de pH



8. Technique des micro- spots

Résumé

Le but de ce travail est l'essai de fabrication d'un fromage frais sous l'action combinée de la chymosine et les ferments lactique à partir du lait entier.

Les résultats de ré-identification des souches (*Lactococcus lactis* subsp.lactis. biovar. *diacetylactis* (SD17) et *Leuconostoc mesenteroides* subsp .*mesenteroides* (19D)) ont permis de ressortir les points suivant : des colonies de forme rondes, lenticulaire et de couleur blanchâtres, Gram positif, leurs arrangement diplocoque, courtes chainettes, Catalase négative, homofermentaire pour les lactocoques et hétérofermentaire pour les leuconostocs.

L'enzyme utilisée possède une activité coagulante de 17.15 unité/ml et une force coagulante 1/4117 avec un temps de floculation de 350 sec.

L'évolution de l'acidité Au bout de 24h d'incubation, révèle que le pH atteint une valeur minimale de 4,9 et l'acidité Dornic augmente jusqu'à 92°D.

En ce qui concerne le fromage on a obtenu un produit ayant une couleur blanchâtre, texture souple, possède un aspect normal, avec une odeur du fromage et son gout est bon.

Mot clé : fromage frais, lait entier, chymosine, ferments lactique (*Lactococcus diacetylactis* « SD17 » ,*Leuconostoc mesenteroides* « 19D »)

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تجريب صنع جبن طازج بواسطة التأثير المشترك للكيموزين و المخمرات اللبنية مع الحليب الكامل الدسم. نتائج اعادة التعرف على كل من السلالات *lactococcus lactis subsp.lactis. biovardiacetylactis* و *leuconostoc mesenteroides subsp .mesenteroides*, سمحت لنا بالتعرف على النقاط التالية العزلات هي مكورات ذات شكل عدسي بيضاء اللون موجبة الغرام متجمعة في ثنائيات و سلاسل قصيرة لها كتلاز سلبي أما فيما يخص نمط التخمر فهو متجانس للعزلات *lactocoque* وغير متجانس بالنسبة للعزلات *Leuconostoc* الأنزيم المستخدم لديه نشاط تخثر 17.15 وحدة/مل قوة نخثر هي 1/4117 ووقت التلبد 350 ثانية تتغير درجة الحموضة بعد 24 ساعة من الحضانة الى 92 °D بينما تصل درجة pH الى قيمة دنيا 4.9 . أما بالنسبة للجبن المصنع هو منتج ذو لون أبيض ، ملمس ناعم، لديه مظهر طبيعي، مع رائحة الجبن ومذاقه جيد

الكلمات المفتاحية : الجبن الطازج، الحليب كامل الدسم، كيموزين، مخمرات اللبن
(*lactococcus diacetylactis* « SD17 » ,*leuconostoc mesenteroides* « 19D »)