

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^{elle}. ABSI NOURA

- M^{elle}. BOUGHARI AMEL

- M^{elle}. LAACHI BAKHTA

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

JURY:	Grade
-Présidente : M ^{elle} MOULAY M.	MCB
-Promoteur: Mr. HOCINE L.	MAA
-Co-promoteur: Mr. HADJ SAID A.	MCA
-Examineurs: Mr. BENBEGUARA M.	MAA

Année universitaire: 2016–2017

Remerciement

Nous rendons grâce à Allah, le Clément, le tout Miséricordieux pour la chance qui nous somme donnée pour suivre nos études supérieures, et pour le courage qu'Il a donné pour nous pour bien mener ce travail Gloire Allah

*Nous exprimons toute notre gratitude et nos vifs remerciements à notre encadreur **Mr HOCIN L**, qui nous a honorés en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité. Merci d'avoir nous guide avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de cette mémoire.*

*On tient à remercier notre Co-promoteur **Mr HADJ SAID A** pour leur aide, leurs conseils, soutien morale et surtout leur encouragement et ses remarque pour contenu de ce travail.*

Nous exprimons toute notre gratitude aux membres de jury :

***M^{lle} MOULAY M** pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury.*

***Mr BENBEGUARA M** pour avoir accepté d'examiner ce travail. Et de vous remercier pour tout ce que vous avez apporté tout au long de nos études.*

*Nos plus vifs remerciements s'adressent au personnel du laboratoire **Kheira, Hasna, Bachir, Houari, Benblima** pour leur patience et leurs précieuses aides, pendant la réalisation de ce travail.*

Nous remercions tous ceux qui nous ont rendu service et qui ont contribué de près ou loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Nous rendons grâce à Allah le tout puissant. Nous vous prions de nous guider sur le droit chemin qui est le vôtre et qui nous mène à votre Paradis Amen.

Je dédie ce travail à :

Ma très cher père « Ahmed » à qui je dois le grand amour et le profond respect, pour sa confiance, ses encouragements et son soutien.

A l'être le plus chère à mon cœur ma mère « Aicha », qui a toujours cru en moi et m'encouragée.

A mes très chers frères, Mohamed, Abd El Kader, Ali, Rabeh et à ma sœur Fatma qui je souhaite beaucoup de réussite et du bonheur dans leur vie future.

A ma chère grand-mère « kheira » et mon cher grand-père « Abd El Kader ». Qui je souhaite la bonne santé.

A tous mes oncles et mes tantes chacun par son noms, et à qui je souhait de bonheur

A toute la famille « LAACHI », et mes très chères amies « Amel, Noura » et l'autre, kheira, Soumia, Souad, Nesrin, Dalal et Djamila

Et à tous ceux qui contribué de près ou de loin pour ce travail soit possible, je vous de dédie merci.

BAKHTA

Dédicace

Nous rendons grâce à Allah le tout puissant. Nous vous prions de nous guider sur le droit chemin qui est le vôtre et qui nous mène à votre Paradis Amen.

Je dédie ce travail :

A la source de la tendresse, ma mère « Halima, Kheira » pour sa gentillesse, sa douceur, pour son affection, son amour ses sacrifices et ses encouragements.

A mon très cher père « Mohamed Bechrif », pour sa confiance, ses encouragements et son soutien

A mes sœurs Nabia, Selma, Soumia, Aya et Besmala et je souhaite beaucoup de réussite dans leur vie future.

A mes chers frères Mourad, Brahim, Khalil et Nassre Elldine et je souhaite le bonheur dans leur vie future. Et les jeunes bourjeons « Nadji siradj Elldin » « Nihal bisan ».

A tous mes oncles et le plus proche « Abd Elhamid »

A toute ma famille « Bechrif », « Khetal », « Mounis » Mes très chers intimes

Noura, Bakhta, Ghazi Djamilia, khadhra, mes amies Souad, Nesrin, Djamilia, Dalal, Sara, Chomaisa, Nana

A toutes qui ma connaît.

Amel

Dédicace

Nous rendons grâce à Allah le tout puissant. Nous vous prions de nous guider sur le droit chemin qui est le vôtre et qui nous mène à votre Paradis Amen.

Avec un énorme plaisir et un cœur et une immense joie, que je dédie ce travail à :

Ma cher père, pour sa confiance et son soutien dans toute carrière d'étude et je souhaite le bonheur et de long vie future.

A l'être le plus chère ma mère, qui toujours sacrifie et encourage durant tous la période d'étude.

Mes chers frères Djilali, Moussa, et mes très chers sœurs Fatima, Fatima et je souhaite le bonheur et beaucoup de réussite dans leur vie future. Et les jeunes bourjeons « Maroua », « Abd elah ».

A tous mes oncles et mes tantes chacun par son noms, et à qui je souhaite de bonheur.

A très chères amies: Amel, Bakhta, Souad, Nesrin, et sans oubliée Djamila, Dalal, Sara, Chomaissa, Naima,

Et à tous ceux qui contribué de près ou de loin pour succès mon travail et gratitude tous qui ma connaît.

Nourâ

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des annexes	
Introduction.....	01
Partie Bibliographie	
Chapitre I : du lait au fromage	
1. Définition du lait.....	02
2. Définition de fromage.....	02
2.1 Principaux types de fromage.....	02
2.2. Fromage frais.....	02
2.3. Fabrication de fromage.....	03
2.3.1. Standardisation du lait.....	03
2.3.2. Coagulation	03
2.3.3. Egouttage.....	03
2.3.4. Salage.....	03
2.3.5. Moulage.....	03
2.3.6. Conservation.....	03
3. Bactéries lactiques... ..	03
3.1 Les ferments lactiques immobilisés.....	04
4. Présure.....	04
4.1 Immobilisation des enzymes.....	04
5. Argile.....	04

Partie expérimentale**Chapitre I: Matériels et méthodes**

1. Objectif de travail.....	05
2. Lieu et durée de travail.....	05
3. Matériels et Méthodes.....	05
3.1. Matériels.....	05
3.1.1. Lait en poudre.....	05
3.1.2. Les bactéries lactiques.....	05
3.1.3. Présure.....	05
3.1.4. Argile.....	05
3.1.5. Produits et milieux de culture.....	05
3.1.6. Matériels et appareillages utilisés.....	06
4. Protocole expérimental.....	07
5. Méthodes.....	08
5.1. Protocole de purification de l'argile.....	08
5.1.2. Protocole de purification de l'argile.....	08
5.2. Ré-identification des souches.....	09
5.2.3 Purification.....	10
5.2.4. Etude morphologique et biochimique.....	10
5.2.4.1. Etude morphologique.....	10
5.2.4.1.1. Caractères macroscopiques.....	10
5.2.4.1.2. Caractères microscopiques.....	10
5.2.4.2. Etude biochimique.....	10
5.2.4.2.1. Test de catalase.....	10
5.2.5. Type fermentaire.....	11
5.2.6. Conservation des souches (courte durée).....	11

6. La fixation des bactéries.....	11
7. La fixation de chymosine	12
8. Le lait.....	14
8.1. La pasteurisation.....	14
8.2. Analyses physico-chimiques.....	14
8.2.1. Ph.....	14
8.2.2 Acidité titrable.....	15
8.2.3. Détermination de la densité.....	15
9. préparations de fromage frais.....	16
9.1. Préparation de pré-culture.....	16
9.2. Ensemencement des ferments lactiques.....	16
9.3. emprésurage.....	16
9.4. Caillage.....	16
9.5. Tranchage.....	16
9.6. Brassage.....	16
9.7.Égouttage.....	17
9.8. Salage.....	17
9.9. Moulage.....	17
9.10 .Conservation.....	17
10. La cinétique de la croissance par la technique des micro-spots.....	17
10.1. pH et acidité Dornic produit.....	17
11. Analyses physico-chimiques et organoleptiques du fromage.....	17
11.1 Ph.....	18
11.2 .Acidité titrable.....	18
11.3 Rendement.....	18
12. Caractéristiques de l'enzyme	18
12.1. Temps de floculation.....	18

12.2 . Activité coagulante.....	18
12.3 .La force coagulante.....	18
13. Analyse sensorielle.....	19

Chapitre II : Résultats et discussions

1. Etude de caractérisation des souches.....	20
1.1. Critères morphologiques.....	20
1.1.1 .Caractérisation macroscopique.....	20
1-1-2Caractérisation microscopique.....	21
1-2 .Etude biochimique.....	22
1-2-1.Test de catalase.....	22
1-3.Le type fermentaire.....	22
2. Paramètres physico-chimiques du lait.....	23
2.1. pH.....	23
2.2. Acidité.....	23
2.3. Densité.....	23
3-Cinétique de croissance.....	24
3-1 pH.....	26
3-2 L'acidité.....	26
3-3.Cinétique de croissance.....	27
4. Paramètres physico-chimiques du fromage.....	27
4.1.pH de fromage.....	27
4.2. Acidité titrable.....	28
4.3. Rendement.....	28
5. Caractérisation d'enzyme utilisée.....	28
5-1.Temps de floculation.....	28
5-2 .Temps de coagulation.....	28

5-3. Activité coagulante.....29

5-4. Force de coagulation.....29

6. Caractéristiques sensorielles.....29

Conclusion

Références bibliographies

Annexes

Résumé

الملخص

Liste des abréviations

CO₂ : dioxyde de Carbone

ENF : Entreprise Nationale des produits fonderie

H₂O₂ : Eau oxygénée

LMA : Laboratoire de microbiologie appliquée

MB : matière brute

MRS: Man Rogosa et Sharpe.

N: Normalité

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

pd : pendant

pH : Potentiel d'hydrogène

Poids C : poids de caillé

Poids L : poids de lait

R_f : Rendement fromager

Sec : seconde

tr : tours

U A C : Unité Activité Coagulante

UFC : Unité formant colonie.

λ : longueur d'onde

Liste des figures

Figure 01 : Diagramme de fabrication du fromage frais	07
Figure 02 : Etapes de la purification de l'argile.....	08
Figure 03 : Etapes de la ré-identification des souches.....	09
Figure 04 : La fixation des bactéries.....	12
Figure 05 : Les étapes de la fixation de l'enzyme	13
Figure 06 :Les principales analyses physico-chymiques du lait utilisé.....	14
Figure 07 : Aspect macroscopique des bactéries lactiques, en milieu (MRS, M17) liquide...20	
Figure 08 : Aspect colonies des bactéries lactiques obtenues après 24 h d'incubation à30°C sur milieu solide.....	21
Figure 09 : Aspect microscopique et arrangement des bactéries lactiques après coloration de Gram,	21
Figure 10 :Test catalase.....	22
Figure 11 : type fermentaire des ferments lactiques (Lactococcus et Leuconostoc).....	23
Figure 12 : Variation de pH des souches (19D et SD17) cultivées sur milieu lait à 30°C.....	24
Figure 13 : Variation de l'acidité des souches (19D et SD17) cultivées sur milieu lait à 30°C.....	24
Figure 14 : Cinétique de croissance des souches (19 D et SD17) Cultivées sur milieu lait à30°C.....	25
Figure 15 : Boite de pétri contenant la gélose MRS au sein desquelles sont déposées des suspensions bactériennes à différentes dilutions (de 10 ⁻¹ à10 ⁻⁶) après incubation à 30°C pendant 24 heures.....	26

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition moyenne du lait de vache.....	02
Tableau 02: Produits et Milieux de culture.....	06
Tableau 03 : Appareillages, verreries et autres.....	06
Tableau 04:paramètres physico-chimiques du lait.....	23
Tableau 05 : Résultats des analyses physico-chimiques du fromage	27
Tableau 06 : Caractérisation d'enzymes utilisé	28
Tableau 07: Evaluation sensorielle de fromage frais préparés.....	30

Liste des annexes

- Annexe 01 : Lait en poudre utilisé
- Annexe 02 : La présure industrielle (chymosine en poudre)
- Annexe 03 : Composition des milieux de culture
- Annexe 04: Coloration de Gram
- Annexe 05 : Standardisation à l'échelle de Mc Farland 5.0
- Annexe 06: Dénombrement des colonies
- Annexe 07: Evaluation sensorielle de fromage frais préparé
- Annexe 08 : Les résultats d'évolution l'acidité, PH et le nombre de micro –spots UFC/ml
- Annexe 09 : Technique de micro-spot
- Annexe 10 : Caractérisations organoleptiques et physico-chimiques du fromage

Introduction

Le lait est un aliment que nous consommons depuis notre naissance. Il joue un rôle essentiel dans notre régime alimentaire journalier, puisqu'il est consommé en grande quantité sous forme de lait de consommation, de produits laitiers variés et sous forme cachée dans les préparations alimentaires diverses (**Cayot et Porient, 1998**).

Ses évolutions physico-chimiques ou biologiques conduisent à une diversité de produits laitiers tels que les fromages (**Jeantet et al., 2007**), qui sont les produits de l'ancienne méthode de conservation du lait après sa coagulation par action conjuguée de la présure et de l'acidification (**Eck et Gillis, 1997**).

L'appellation « fromage frais » évoque chez le consommateur une notion de produit non affiné, d'assez courte durée de vie et conservé à basse température (**Luquet, 1990**). Les levains mésophiles constitués de *Lactococcus* et *Leuconostoc* participent à la fabrication du fromage frais (**Federighi, 2005**). La présure est extraite du 4^{ème} estomac du veau non sevré (**Werner et al., 2010**), elle consiste à transformer le lait de l'état liquide à l'état de gel (**Jeantet et al., 2007**).

Certains microorganismes peuvent s'attacher aux surfaces solides par leurs propriétés bioadhésives pour former un biofilm, lequel peut être utilisé par exemple comme un biosorbant.

L'immobilisation de l'enzyme permet également de stabiliser l'enzyme et d'augmenter ainsi sa durée de vie (**Roche, 2011**).

C'est dans ce contexte que notre travail est mené pour connaître l'effet de l'immobilisation sur des particules argileuses des deux ferments (*Lactococcus diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides*) et de l'enzyme (chymosine) sur la qualité organoleptique et le rendement du fromage frais.

M1. Définition du lait

Le lait est un mélange liquide de nombreuses substances dont certaines, telles le lactose ou les caséines n'appartiennent qu'à lui et une multitude de constituants qu'on peut néanmoins classer en petit nombre de catégories comme pour toute autre matière vivante (**Mathieu, 1998**) comme le montre le tableau 1.

Tableau 01 : Composition moyenne du lait de vache (Mathieu ,1998).

La composition moyenne du lait de vache (g/l)	
-Eau	902
-Glucides (essentiellement représentés par le lactose)	49
-Matières grasses	38
-Protéines	
-Caséines	26
-Protéines solubles	6
-Sels	9
-Autre substances	1.5

2. Définition du Fromage

La dénomination fromage est réservée aux produits fermentés ou non, affinés ou non, obtenus à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matières grasses, babeurre, utilisées seules ou mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse (**Joffin et Joffin, 2010**).

2.1. Principaux types de fromage

Ces produits sont obtenus du lait coagulé, égoutté, qui subit ensuite une maturation ou un affinage plus ou moins long ce qui donne des fromages de types variés. On classe les fromages selon leur aspect et leur fabrication, on peut les classer également par ordre d'humidité décroissante (**Clavier, 2001**):

- Les fromages frais : fromages blancs, petits suisses ;
- Les fromages à pâte molle avec moisissures externe, ou à croûte fleurie : camembert, coulommiers, brie etc ;
- Les fromages à pâte molle à croûte lavée : Munter, pont-l'évêque, livarot etc ;
- Les fromages à pâte pressée, non cuite : cantal, saint Paulin, tome etc ;
- Les fromages à pâte pressée cuite : emmental, grugère, beaufort etc ;
- Les fromages fondus : différents fromage broyés et fondus, puis façonnés.

2.2. Fromage frais

L'appellation " fromages frais "évoque chez le consommateur une notion de produit non affiné, d'assez courte durée de vie, et conservé à basse température (**Luquet, 1990**).

2.3. Fabrication de fromage

2.3.1. Standardisation du lait

La qualité de lait de fromagerie peut être définie comme l'aptitude à donner un coagulum permettant d'aboutir, dans des conditions normales de travail, à un fromage aux caractéristiques physico-chimiques définies et avec un rendement satisfaisant (**Jeantet et al., 2007**).

2.3.2. Coagulation

Le caillage consiste à faire coaguler la caséine du lait. On procède de deux façons naturellement, il suffit de laisser agir les ferments lactiques contenus dans le lait, souvent on accélère la coagulation en ajoutant de la présure du lait. Les deux techniques peuvent être combinées (**Cantin, 2013**).

2.3.3. Egouttage

Il permet de séparer le caillé du lactosérum qui sera alors éliminé. Celui-ci est plus ou moins riche en minéraux, protéines solubles et contient des traces de lactose. Différentes étapes sont nécessaires pour accélérer l'égouttage (**Fredot, 2005**):

- découpage : on tranche le caillé ;
- brassage assurant une agitation des grains de caillé.

2.3.4. Salage

Le salage joue un triple rôle en contrariant certaines proliférations microbiennes, en complétant l'égouttage du caillé et en relevant sa saveur. On peut saler à l'aide de sel fin, pur, sec et bien égrugé, le produit est répondu en surface ou incorporé directement dans la masse par pétrissage, on peut aussi effectuer le salage en plongeant les fromages dans un bain de saumure à saturation (**Roger, 1975**).

2.3.5. Moulage

Le moulage consiste en une mise en forme dans des moules ou faisselles dont découleront l'aspect extérieur et la forme du fromage (**Moulay, 2014**).

2.3.6. Conservation

On conserve le produit fini à température de 4°C pendant 12 h puis on fait les analyses microbiologiques, physicochimiques et organoleptiques (**Moulay, 2014**).

3. Bactéries lactiques

Sont des micro-organismes assez hétérogènes sur les plans morphologie et physiologie, qui produisent des quantités importantes d'acide lactique. Ce sont des bactéries Gram+, ne produisant pas de catalase. Elles sont anaérobies mais aérotoles. Certaines espèces produisent au moins 1,8 mole d'acide lactique par mole de glucose fermenté. Ce sont des bactéries lactiques homofermentaires. D'autres produisent environ 1 mole d'acide lactique par

mole de glucose fermenté et des quantités de produits secondaires principalement (CO₂, l'éthanol, acide acétique).

Les bactéries lactiques regroupent un certain nombre d'espèces appartenant aux familles des *Streptococcaceae* et des *Lactobacillaceae*. Les représentants de la famille des *Streptococcaceae* appartiennent aux genres *Streptococcus* et *Leuconostoc* (Eck, 1987).

3.1 Les ferments lactiques immobilisés

L'immobilisation ou la fixation des cellules microbiennes peut être définie comme la localisation des cellules entières dans l'espace en réaction avec conservation de leurs propriétés catalytiques si bien qu'il est possible de les utiliser de façon répétitive et continue (Bourgeois et Larpent, 1989).

4. Présure

La présure est un liquide sécrété par l'estomac des jeunes ruminants (Fredot, 2009) ; c'est un mélange de chymosine (80 %) et de pepsine (20%) (Eck, 1987).

D'après Jeantet *et al.*, (2007), la déstabilisation des micelles de caséine par la présure aboutissant à la formation d'un gel pouvant se décomposer en trois étapes :

- hydrolyse enzymatique de la caséine κ ;
- agrégation des micelles de caséines déstabilisées ;
- formation d'un réseau gélifié par réticulation.

4.1 Immobilisation des enzymes

L'immobilisation des enzymes induit une modification de leur activité et généralement une augmentation de leur stabilité. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend de la nature intrinsèque de l'enzyme, des conditions d'immobilisation et de la nature du matériau support utilisé (Jarrar, 2011).

5. Argile

L'argile est constituée de particules cristallines qui proviennent de la décomposition chimique des constituants de la roche. Les minéraux argileux sont des particules très fines dont le diamètre équivalent est normalement inférieur à 0,002 mm.

La bentonite est un minéral argileux, dont les propriétés sont similaires à celle de la montmorillonite qui a de nombreuses applications industrielles (Robitaille et Tremblay, 1997).

1. Objectifs de l'étude

Notre travail repose sur l'utilisation de l'argile comme un support solide pour immobiliser les bactéries lactiques (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) et également l'enzyme (chymosine) et ce pour déterminer :

- L'effet de l'immobilisation des bactéries lactiques utilisées et l'enzyme sur l'évolution des paramètres physico-chimiques et organoleptiques du fromage ;
- L'effet sur le rendement fromager.

2. Lieu et durée de travail

L'expérimentation a été effectuée au sein des laboratoires de microbiologie, technologie alimentaire et physiologie végétale, au niveau de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Ibn Khaldoun, Tiaret, durant une période allant du 14 février au 30 mai 2017.

3. Matériels et Méthodes

3.1 Matériels

3.1.1 Lait en poudre

C'est un lait entier en poudre vendu dans le commerce sous l'appellation « Celia », contenant 25g de protéines et 26g de matière grasse dans 100g de poudre, comme l'indique l'annexe 01.

3.1.2. Les bactéries lactiques

Les ferments lactiques utilisés sont: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* «SD17» et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* «19D»). Ils proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA) de l'université Ahmed Benbella Oran 1. Ces espèces ont été isolées à partir du lait cru de chèvre d'une population caprine locale de la région Oranaise de l'ouest d'Algérie.

3.1.3.Présure

La présure utilisée est une chymosine qui nous a été offerte par l'unité GIPlait Sidi Khaled Tiaret.

L'activité enzymatique du produit est uniquement due à la chymosine (EC 3. 4. 23. 4) (annexe 02).

3.1.4.Argile

L'argile utilisée dans notre travail nous a été offerte par l'entreprise de fonderie de Tiaret. Elle provient d'un gisement près de Maghnia, située à l'ouest de Tlemcen. Elle est commercialisée par ENF (Entreprise Nationale des fonderie) sous l'appellation de bentonite de fonderie (**Tiffour et al., 2014**).

3.1.5. Produits et milieux de culture

Les produits et les milieux de cultures utilisés dans notre expérimentation sont présentés dans le tableau 02.

Tableau 02: Produits et Milieux de culture

Produits	milieux de culture
-Solutions de coloration de Gram : -Violet de gentiane ; - Lugol ; - Fuchsine ; - Alcool -Eau distillée ; -Eau oxygénée ; -Eau de javel ; -Huile à immersion ; -Hydroxyde de sodium NaOH (0.1N) ; -Chlorure de sodium sel de table (10g/500ml) ; -Phénophtaléine.	Milieu MRS (liquide, solide) ; Milieu M17 (liquide) ; Lait écrémé. Les compositions des milieux de cultures sont indiquées dans l'annexe 03.

3.1.6. Matériels et appareillages utilisés Le matériel utilisé dans notre expérimentation est présenté dans le tableau 03.

Tableau 03 : Appareillages, verreries et autres

Appareillages	Verreries	Autres
-Autoclave « WOLF » ; -Etuve « MEMMERT » ; -Microscope optique « OPTIKA » ; -Réfrigérateur « IRIS » ; - Balance analytique « SARTORIUS et KERN » ; -PH-mètre LEYBOLD-HERAEUS » ; -Agitateur magnétique thermique « HEITO » ; -Spectrophotomètre UV –1600PC; -Centrifugeuse « SIGMA » ; -Bain Marie « HEIDOLPH » ; -Thermo- lactodensimètre ; -Vortex.	-Tubes à essai ; -Pipettes graduées ; -Béchers ; -Burettes graduées ; -Dessiccateur ; - Capsules ; -Thermomètre ; -Cristallisoir ; - Lames ; -Eprouvettes ;	-Bec bunsen ; -Tamis 40µm ; -Barreaux magnétiques ; -Cloche du Durham ; -Portoirs ; -Spatule ; -Anse de platine, Pince ; -Pissettes ; -Boîtes de Pétri ; -Bac de coloration ; -Flacons ; -Micropipette ; -Eppendorfs ; -Papier aluminium ; -Tissu (chèche).

4. Protocole expérimental

La figure 01 montre le protocole expérimental global de la fabrication du fromage frais

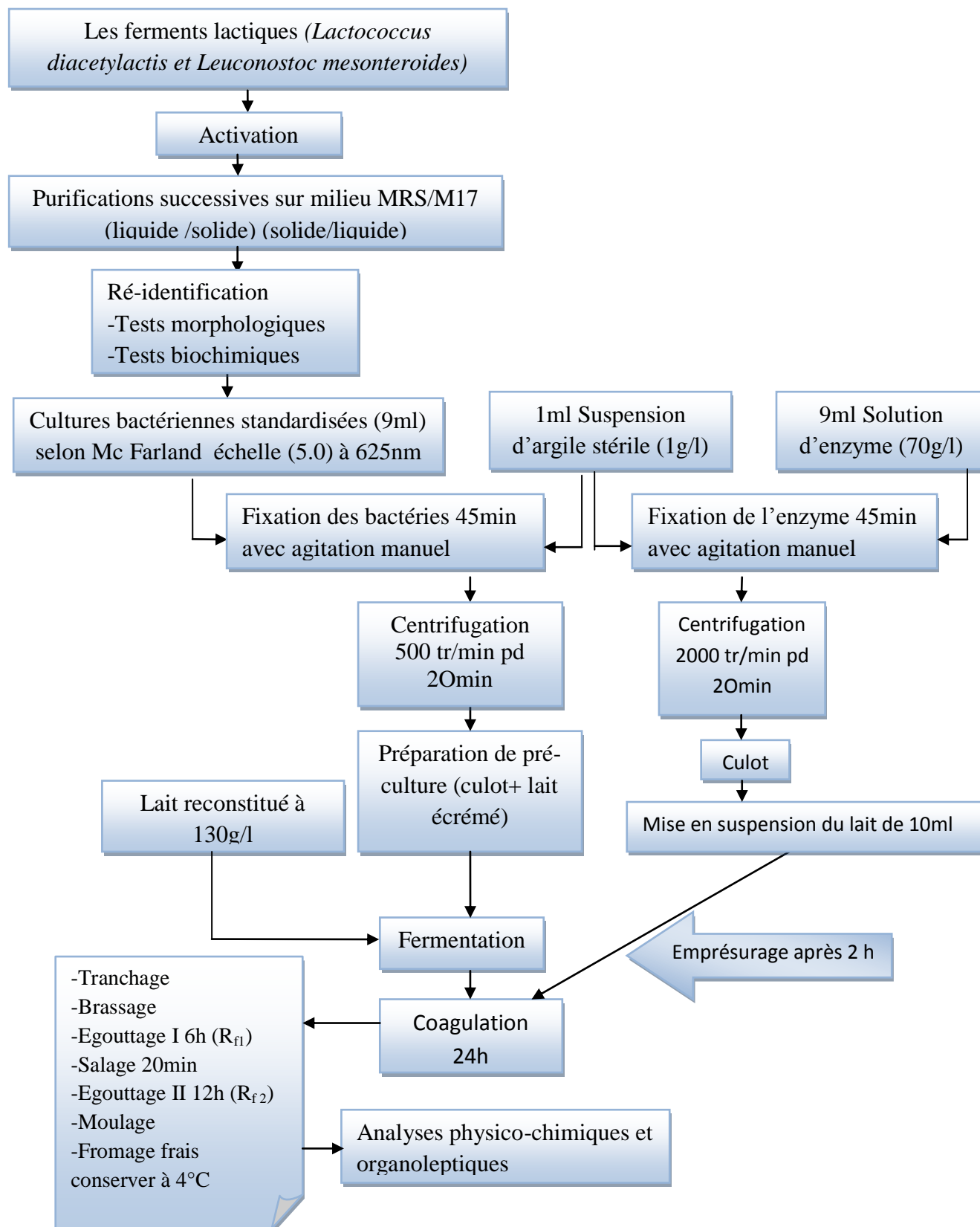


Figure 01 : Diagramme de fabrication du fromage frais

5. Méthodes

5.1. Protocole de purification de l'argile

5.1.2. Protocole de purification de l'argile

La figure 02 montre les étapes de purification de l'argile.

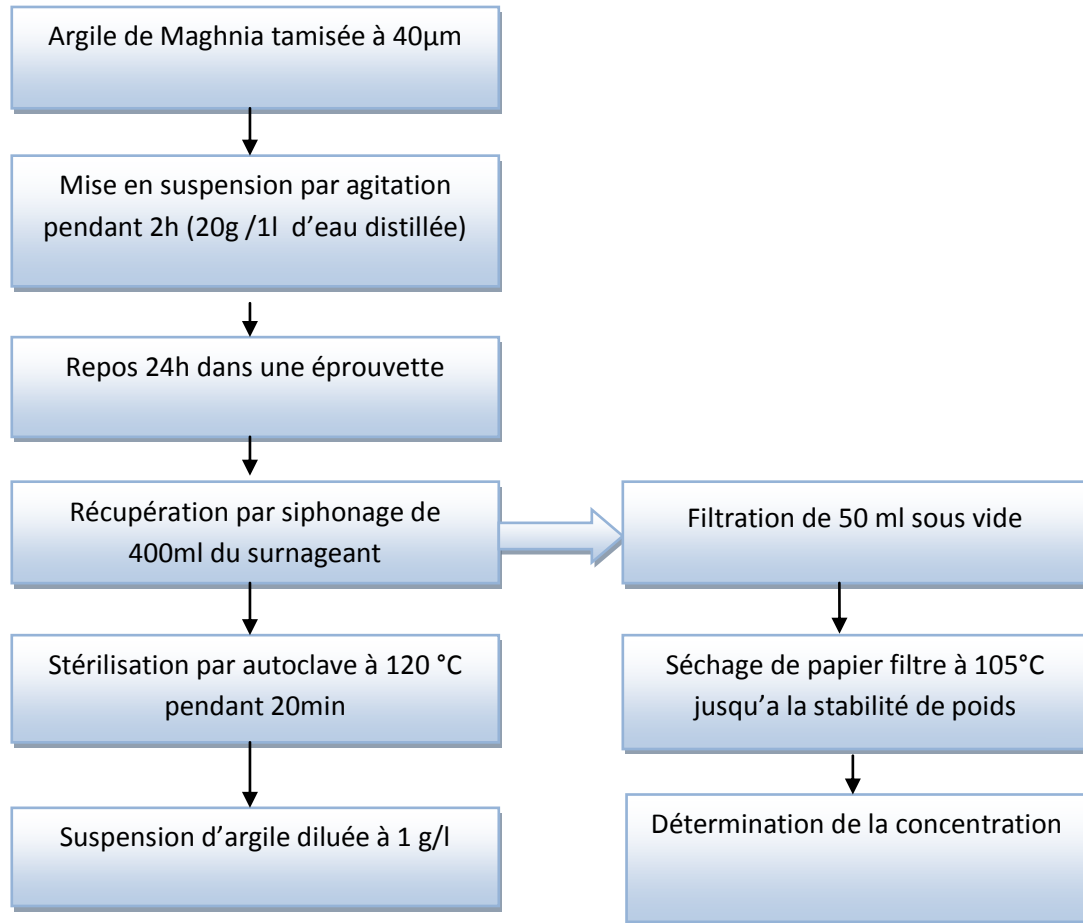


Figure 02 : Etapes de la purification de l'argile.

5.2. Ré-identification des souches

La figure 03 représente les étapes de la ré-identification des souches

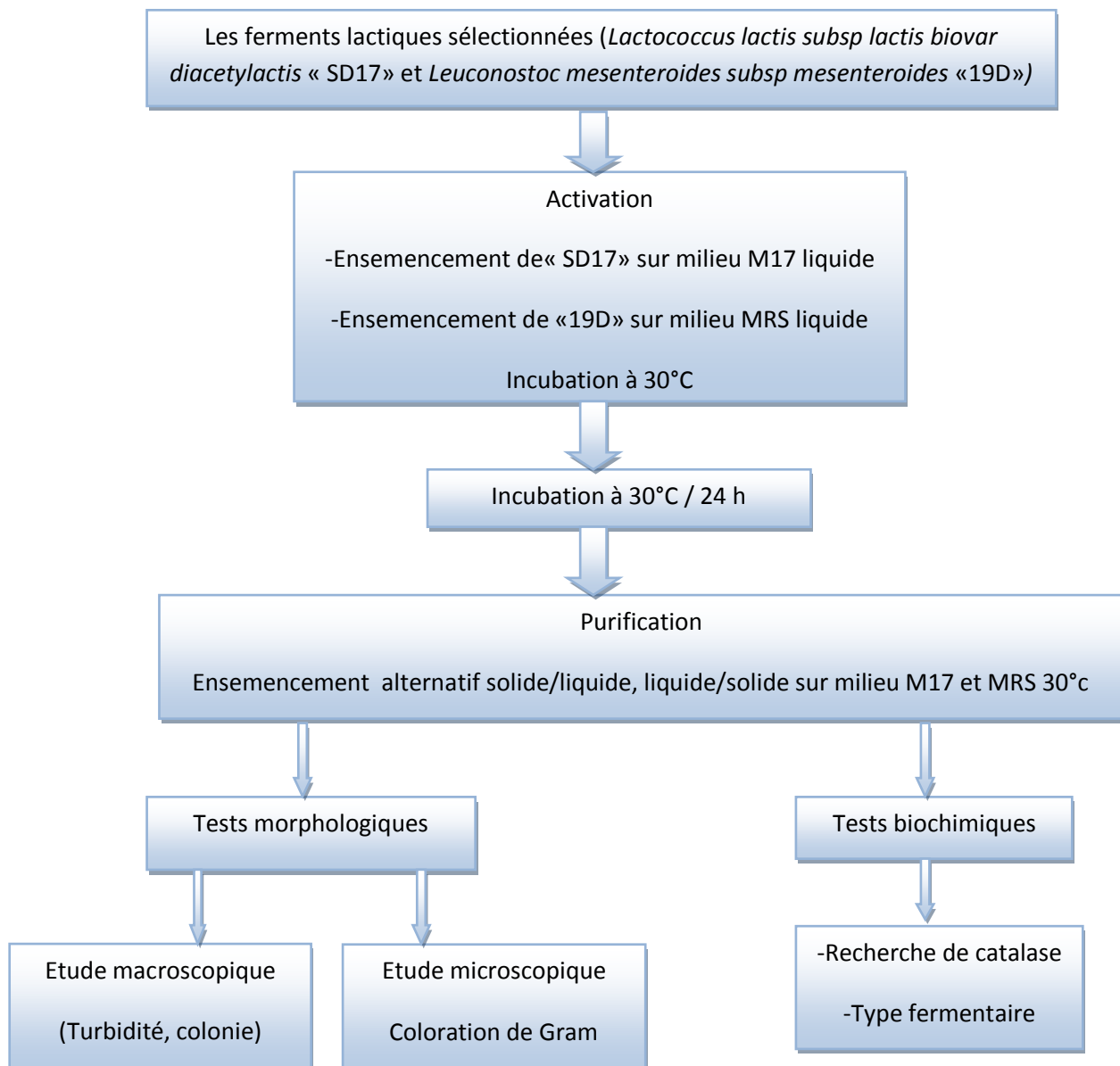


Figure 03 : Etapes de la ré-identification des souches

Les souches utilisées sont sous forme congelées en cultures pures additionnées au lait écrémé et glycérol et extrait de levures. Elles sont activées et entretenue par repiquage (**Guiraud, 1998**) comme suit :

- Déposer une goutte d'inoculum dans 5 ml de milieu de culture M17 bouillon pour les *Lactocoques* et MRS pour *Leuconostoc* ;
- Incubation 30°C pendant 24 h ;
- Après ce délai, observer à l'œil nu les cultures et noter une turbidité, trouble plus ou moins intense (**Delarras, 2007**).

5.2.3. Purification

Après l'activation des cultures en bouillon M17 et MRS pour *Lactocoques* et *Leuconostocs* respectivement (**Moulay et al., 2006 ; Kihal et al., 2009**), les cultures sont ensuite purifiées par stries sur gélose M17 ou MRS et mises en incubation à 30°C pendant 24h (**Moulay et al., 2006; Moulay et al., 2013**) .

Les colonies à Gram+ et catalase- sont repiquées de façon alternée sur milieu MRS liquide et solide (*Lactocoques*) ou M17 liquide ou solide (*Leuconostocs*), jusqu'à l'obtention des cultures pures (**Zarour et al., 2012; Guetouache et al., 2015**). L'identification des micro-organismes ne peut être conduite que sur une souche pure. Cette méthode comporte une série d'étapes, se succédant le plus souvent dans un ordre déterminé. Parmi ces principales étapes de l'identification bactérienne on a : l'étude morphologique, caractères culturels observés sur les milieux, étude de la respiration (catalase), caractères biochimiques (**Bourdon et Marichal, 1973**).

5.2.4. Etude morphologique et biochimique

5.2.4.1. Etude morphologique

5.2.4.1.1. Caractères macroscopiques

Cette recherche doit être effectuée à partir d'une culture de 24h de la souche purifiée pour noter l'aspect des cultures en milieu liquide (trouble), et on note la forme, la taille, la couleur et l'aspect des colonies des cultures sur milieu solide (**Bourgeois et Leveau, 1980 ; Senouci et Abdelouahid, 2010**).

5.2.4.1.2. Caractères microscopiques

-Coloration de Gram

L'étude microscopique permet d'observer la morphologie des cellules, leur taille, leur mode de groupement et le Gram (positif ou négatif), (**Bourgeois et Leveau, 1980**). Les étapes de la technique de coloration de gram sont présentées dans l'annexe 04

5.2.4.2. Etude biochimique

5.2.4.2.1. Test de catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives, elle décompose l'eau oxygène qui se dégage. La recherche de cette enzyme est utile

pour différencier les bactéries (**Delarras, 2007**). D'après **Joffin et Leyral, (2006)** La réaction catalysée est la suivante: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

-Mode opératoire

Prendre une lame porte objet propre. Déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée et émulsionner un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose. Le dégagement des bulles de gaz indique la présence de la catalase : catalase + si non catalase négative (**Delarras., 2007**).

5.2.5. Type fermentaire

L'étude du métabolisme de glucide par la voie fermentaire est réalisée en cloche de Durham après incubation à 30°C. La fermentation se traduit par l'observation d'un dégagement gazeux dans la cloche (**Larpen, 1997**).

Selon **Fredot (2005)** les bactéries lactiques sont :

Soit Homofermentaires : l'acide lactique est le produit de la fermentation du glucose (absence des bulles de gaz dans la cloche),

Soit hétérofermentaire : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO₂ et autres acides organiques (présence des bulles de gaz dans la cloche).

5.2.6. Conservation des souches (courte durée)

La méthode courante utilise des tubes de milieu solide inclinés. Une fois ensemencés, les tubes sont placés à l'étuve pour que la croissance débute puis, avant qu'elle ne soit trop abondante, les tubes sont placés dans une armoire réfrigérée à 4°C pendant 3 à 4 semaines (**Guiraud, 1998**).

6. La fixation des bactéries

L'immobilisation ou la fixation des cellules microbiennes peut être définie comme la localisation des cellules entières dans l'espace en réaction avec conservation de leurs propriétés catalytiques si bien qu'il est possible de les utiliser de façon répétitive et continue (**Bourgeois et Larpen, 1989**).

-Mode opératoire

-Préparation de deux cultures jeunes (19D et SD17) cultivées respectivement sur milieux MRS et M17 liquide.

-standardisation des cultures bactériennes à l'aide d'un spectrophotomètre selon McFarland 5.0 ou à DO de 0.8 à 1,0 (correspond à une concentration de $1,5 \times 10^9$ UFC /ml. Lue à $\lambda=625\text{nm}$ (annexe 05).

-L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau distillée stérile.

-9ml de chaque culture bactérienne standardisée additionnés à 1ml d'argile dilué (1g/L) est laissés en contact à une température 20°C avec une agitation chaque 10 min jusqu'à 45 min

- Récupération de culot après une Centrifugation 500tours/min pendant 20 min

Le protocole de la fixation des bactéries sur l'argile est indiqué dans la figure 04:

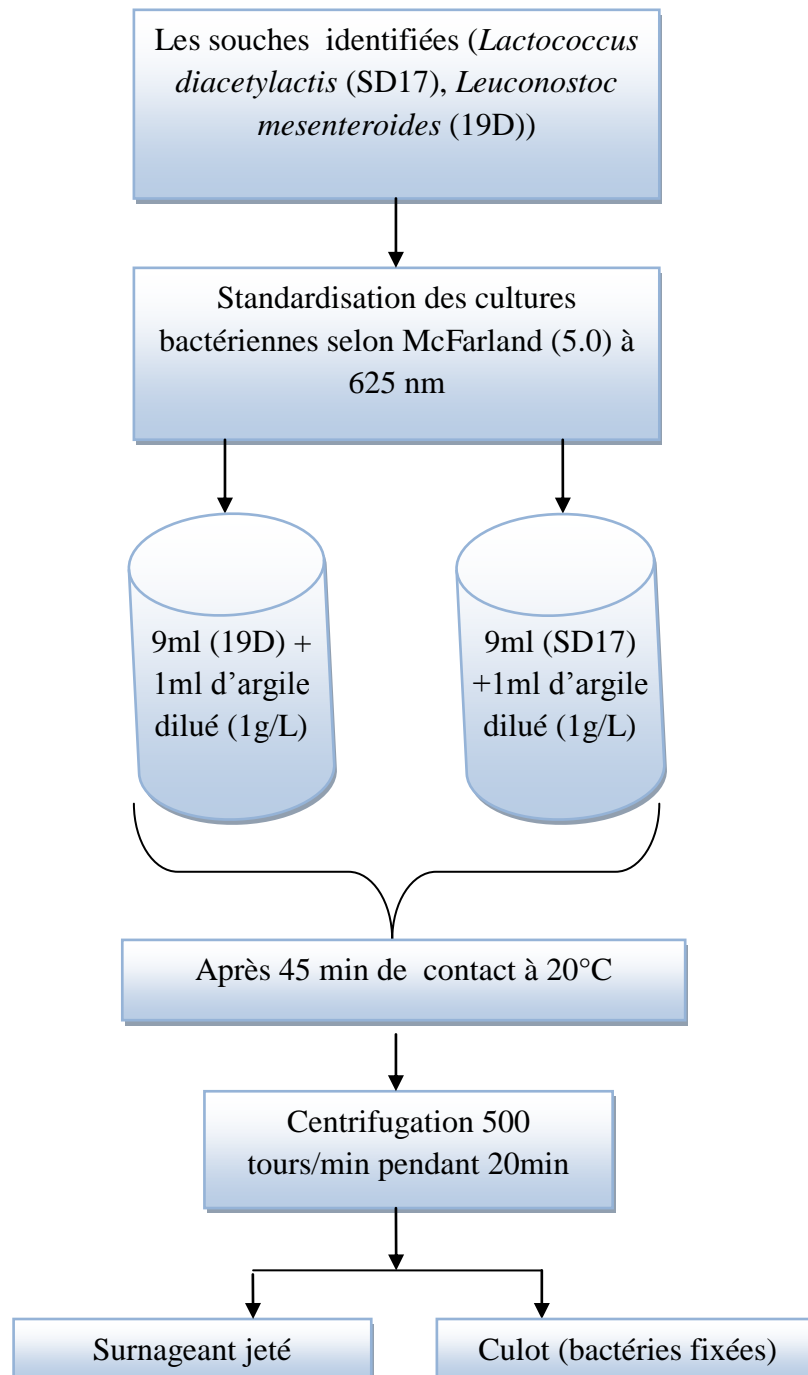


Figure 04: La fixation des bactéries

7. Fixation de chymosine

La chymosine est une enzyme de la caillette (partie stomacale) du veau obtenue par macération (**Guiraud, 1998**). On dira qu'une enzyme est immobilisée quand les molécules de l'enzyme sont macroscopiquement confinées (**Burstein, 2000**).

La fixation de l'enzyme par l'utilisation de l'argile est présentée dans la figure 05

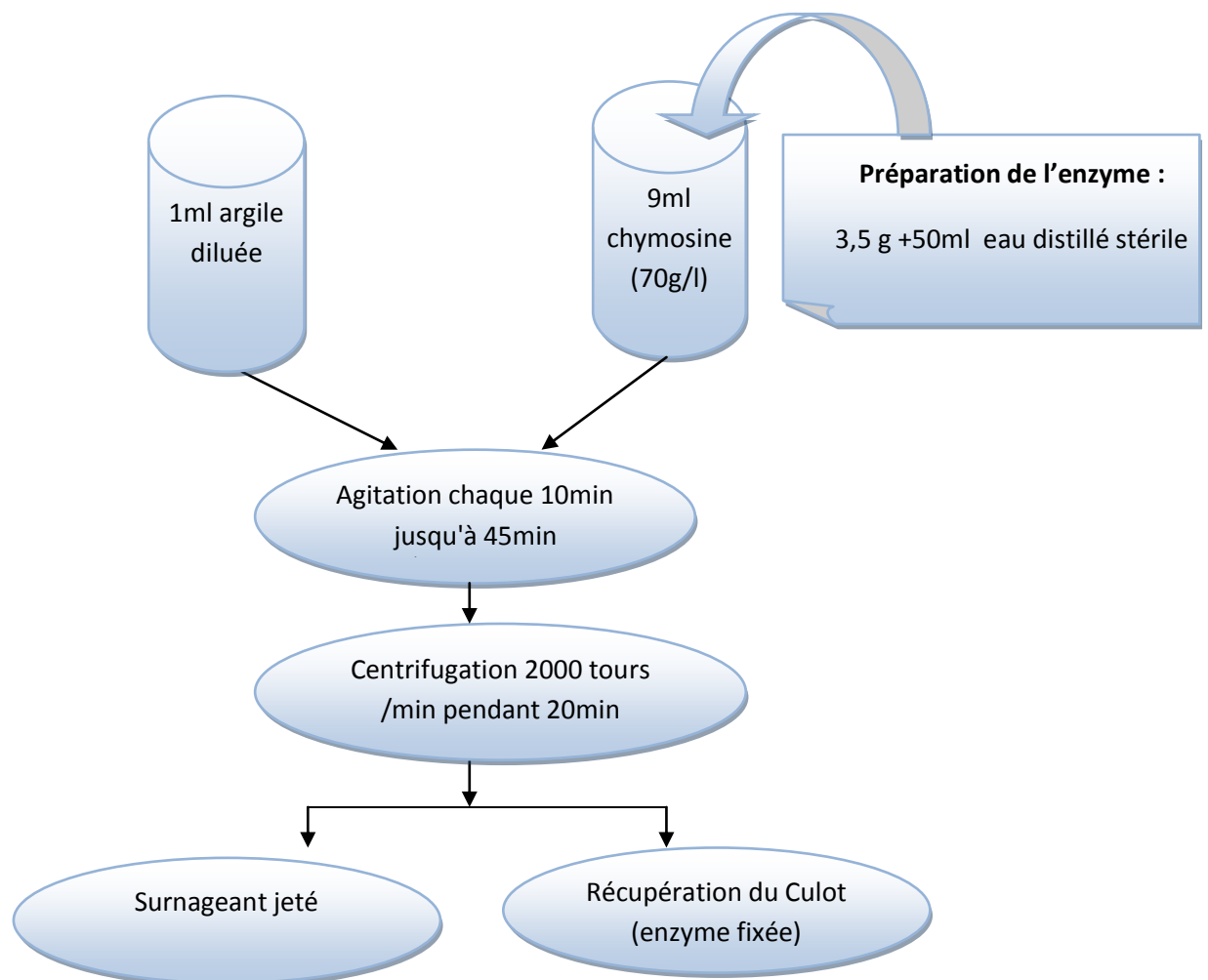


Figure 05 : Les étapes de la fixation de l'enzyme

8. Préparation du lait

Le lait que nous avons utilisé pour la fabrication du fromage est le lait en poudre (Celia). La figure 06 représente les principales analyses physico-chimiques effectuées sur le lait préparé.

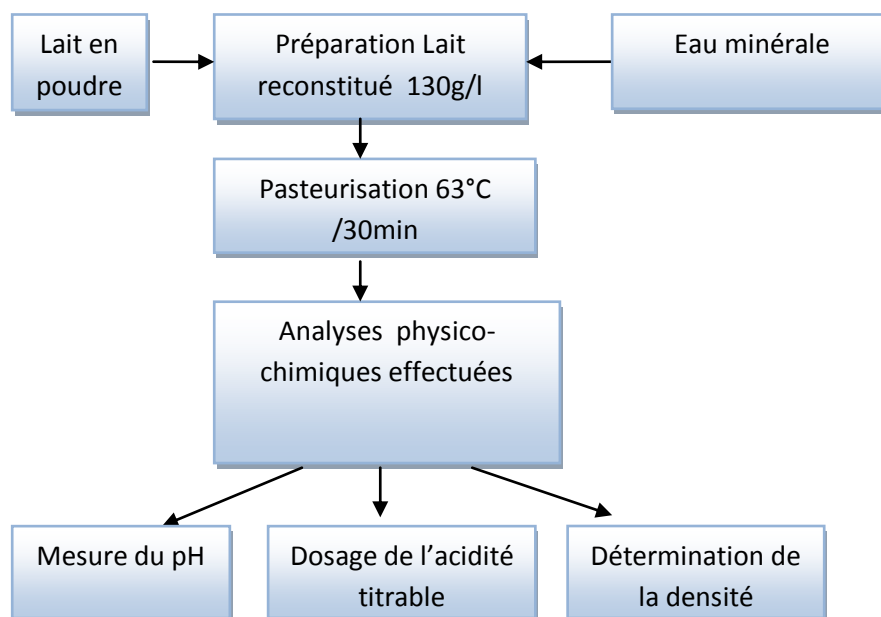


Figure 06 : Les principales analyses physico-chimiques du lait utilisé

-Mode opératoire

Pour la reconstitution du lait, peser 130g de poudre (Celia) et les mettre aseptiquement dans un bécher stérile, ajouter de l'eau, tout en agitant à l'aide d'un agitateur magnétique, jusqu'à obtention de 1l de lait reconstitué.

8.1. Pasteurisation :

-principe

La pasteurisation est un traitement thermique qui entraîne la destruction de la plupart des formes végétatives de la flore banale et celle de tous les micro-organismes pathogènes (**Guiraud, 1998**). Selon **Joffin et Joffin (2010)**, la pasteurisation du lait s'effectue à une température de 63 °C pendant 30min.

- Mode opératoire

On met le lait préparé au bain marie à 63°C pendant 30 min.

8.2. Analyses physico-chimiques

8.2.1. pH

L'acidité du lait peut être déterminée par des papiers imprégnés d'indicateurs colorés (papier indicateur). Et aussi à l'aide d'un pH-mètre muni d'une électrode (**Guiraud ,1998**).

-Mode opératoire

- 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 sur l'écran.

8.2.2 Acidité titrable

L'acidité du lait peut être exprimée en grammes d'acide lactique par litre de lait. Un échantillon précis de 10 ml de lait est placé dans un bécher de 10ml en présence de 0.1 ml de phénol phtaléine à 1%, On titre avec la soude (1/9 N) jusqu'au virage au rose de l'échantillon, en comparaison avec la couleur du lait frais. Noter le volume de NaOH versé (**Guiraud, 1998**).

L'acidité produite est calculée comme suit :

$$\text{Acidité} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

V_{NaOH} = Volume de la soude coulée

L'acidité est exprimée en degré Dornic où $1^{\circ}\text{D} = 0.1\text{g/l}$ d'acide lactique.

8.2.3. Détermination de la densité

La densité sera prise sur l'échantillon à l'aide d'un thermo-lactodensimètre, cet instrument étant gradué à 15°C, il faut donc prendre la température du lait et corriger sa densité, si nécessaire pour une température différente à 15°C (**vaillant, 1936**).

-Mode opératoire

Dans une éprouvette de 100ml remplie de lait à analyser, plonger le lactodensimètre. La lecture de la valeur de la densité est faite lorsque l'instrument se stabilise. Noter la température indiquée sur le lactodensimètre.

9. préparations de fromage frais

Les étapes successives pour la fabrication de fromage frais sont les suivantes

9.1. Préparation de pré-culture

-9ml de chaque culture bactérienne standardisée (19D et SD17) additionné à 1ml d'argile diluée (1g/l), et mises en contact à une température de 20°C avec une agitation chaque 10 min jusqu'à 45 min;

- récupération des culots par une Centrifugation 500tours/1min pendant 20 min ;

- ajouter les culots obtenus séparément dans deux tubes contenant 10ml de lait écrémé stérile ;

- incubation à 30°C pendant 24h ;

Les deux cultures représentent le starter de fermentation (**Moulay, 2014**).

9.2. Ensemencement des ferments lactiques

On transfère le contenu de chaque tube du lait écrémé coagulé dans un cristallisateur stérile contenant 480 ml de lait reconstitué et pasteurisé puis homogénéisé. Cette opération est dupliquée: l'une servira à l'étude de la cinétique et l'autre pour la production du fromage frais.

9.3. Emprésurage

Après une durée de maturation de deux heures, on ajoute le chymosine fixée (culot) puis homogénéisation.

9.4. Caillage

Son but est d'assurer la précipitation de la caséine grâce au caillage du lait. Il consiste en la coagulation du lait c'est-à-dire son passage de l'état liquide à l'état solide ce qui forme le caillé (**Trémolières et al., 1980**).

9.5. Tranchage

Le tranchage consiste à couper le gel en portions égales afin d'accroître la surface d'exsudation du lactosérum. L'incidence du tranchage sur l'égouttage est considérable ; Il est le facteur le plus actif sur la séparation du lactosérum (**Eck et Gillis, 1997**).

9.6. Brassage

Le brassage consiste à agiter modérément, dans le lactosérum, les grains de caillé obtenus après tranchage afin de maintenir libres les surfaces d'exsudation formées (**Eck et Gillis, 1997**).

9.7.Égouttage

Se traduit macroscopiquement par une élimination progressive de lactosérum qui s'accompagne d'une rétraction et d'un durcissement corrélatif du gel (Eck et Gillis, 1997), où le caillé est séparé du lactosérum par filtration dans un tissu (chèche).

9.8. Salage

Le fromage peut être salé par immersion dans un bain de saumure (eau+ sel) (**Emilie, 2009**). Nous avons utilisé une solution de NaCl de la cuisine d'une concentration de 10 g dans 500 ml d'eau distillée. Laisser agir pendant 20min, puis faire un deuxième égouttage.

9.9. Moulage

Cette étape permet de donner la forme définitive au fromage par l'utilisation des moules.

9.10 .Conservation

On conserve le fromage préparé dans un réfrigérateur à une température de 4°C jusqu'au moment d'analyses.

10. La cinétique de la croissance par la technique des micro-spots

Le dénombrement est une technique permettant de quantifier à l'œil le nombre d'unités formant colonies(UFC). La méthode des micro-spots est une méthode de dénombrement facile et moins consommatrice de matériel microbiologique par rapport à la méthode classique. On effectue des dilutions successives au dixième dans l'eau distillée et on dépose 10µl de chaque dilution bactérienne (spot) sur une surface de gélose MRS, 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 pendant 24 h. Les micro-spots contenant 3 à 60 bactéries sont dénombrés. (**Bulard, 2012**). Nous avons préparé six dilutions, pour chaque dilution nous avons reproduit six dépôts de spots.

10.1. pH et acidité Dornic produit

Parmi les nombreuses caractéristiques du lait : masse volumique, matière sèche, etc., deux dépendent essentiellement de ses substances acides ou basique : le pH et l'acidité. Ceux-ci ont une importance exceptionnelle par l'abondance des indications et des renseignements qu'elles donnent sur la richesse du lait en certains de ces constituants, son état de fraîcheur ou sa stabilité (**Mathieu, 1998**).

-Mode opératoire

-Le pH des différents échantillons est mesuré à l'aide d'un PH-mètre

- Pour l'acidité, 10ml de lait additionnés de 3 gouttes de phénolphtaléine sont titrés par une solution de soude 1/9 N jusqu'au virage de l'indicateur coloré qui passe de l'incolore au rose.

11. Analyses physico-chimiques et organoleptiques du fromage

Les analyses physico-chimiques effectuées sur le fromage comportent : La mesure du pH, l'acidité Dornic et la détermination du rendement.

11.1 pH

Le principe consiste en la mesure du pH à l'aide d'un pH- mètre, l'appareil est calibré par des solutions tampons 4 et 7 (**Moulay, 2014**).

-Mode opératoire

- 4 g de fromage dilué dans 40ml d'eau distillée ;
- La valeur du pH est lue sur l'échelle graduée du pH mètre.

11.2 .Acidité titrable

Pour déterminer l'acidité prendre 4 g de fromage préparé dilué dans 40 ml d'eau distillé, additionné de quelques gouttes de phénophtaléine. On effectue la lecture à partir de la quantité de soude utilisée dans le titrage.

Selon **Mathieu (1998)**, on exprime l'acidité en degrés dornic

$$1^{\circ}\text{D} = 0.1\text{g d'acide lactique par litre de lait}$$

11.3 Rendement

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, 1987**).

Selon **kouniba et al., (2007)**, le rendement est déterminé ainsi :

$$\text{MB} = (\text{poids C} / \text{poids L}) \times 100$$

MB : matière brute

Poids C : poids de caillé

Poids L : poids de lait

12. Caractéristiques de l'enzyme

12.1. Temps de floculation

Selon **Ramet et weber (1980)** La détermination du temps de floculation consiste l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu.

Dans un tube à essai, un volume de 10ml de lait est additionné de 1ml de solution enzymatique et porter à 30 °C dans un bain marie. Noter le temps (en secondes) d'apparition des premiers flocons.

12 .2 . Activité coagulante

Selon **Boughellout (2007)**, l'unité d'activité coagulante (U .A .C) ou l'unité présure est définie par la quantité d'enzyme contenu dans 1ml qui peut coaguler 10ml de lait à 30°C.

Où

U. A. C : Unité Activité Coagulante

$$U. A. C = 10 \cdot V / T \cdot V'$$

V : Volume du lait

V' : Volume de l'extrait enzymatique

T : Temps de floculation

12.3 .La force coagulante

Selon **Adoui (2007)**, la force ou l'unité soxhlet correspond au nombre d'unité de poids ou de volumes de lait coagulable en 40 min par une unité de poids ou de volume de préparation enzymatique ; elle est calculée selon l'équation suivante

$$\text{Force} = \frac{2400 \cdot V}{T \cdot V'}$$

Où

2400 : 40 min x 60sec

V : volume du lait en ml

V' : volume de l'extrait enzymatique en ml

T : temps de floculation en secondes

13. Analyse sensorielle

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 arôme stimulent les sens de la vue, du toucher, de l'odorat et du goût et provoquent des réactions plus ou moins vives d'acceptation ou de rejet) (ECK et Gillis ,1997).

Ce test a pour objectif de déterminer la mesure dans laquelle le consommateur accepte un produit. L'acceptation d'un produit alimentaire indique en général la consommation réelle de ce produit (Moulay, 2014).

Les évaluations sensorielles des produits expérimentaux sont réalisées dans une salle au laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la Nature et de la Vie Université de Ibn –Khaldoun Tiaret, par un jury de 10 dégustateurs avec des fiches de dégustations.

1. Etude de caractérisation des souches

1.1. Critères morphologiques

1.1.1 .Caractérisation macroscopique

L'étude des caractéristiques macroscopiques des deux souches (19D, SD17) sur milieu M17 et MRS servent de base à l'identification du genre.

-Sur milieu liquide : L'observation macroscopique du développement des isolats (*Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* Subsp *mesenteroides*) sur milieu M17 et MRS liquide respectivement, a permis de remarquer la présence de trouble signifiant ainsi une croissance bactérienne (Voir figure 07).

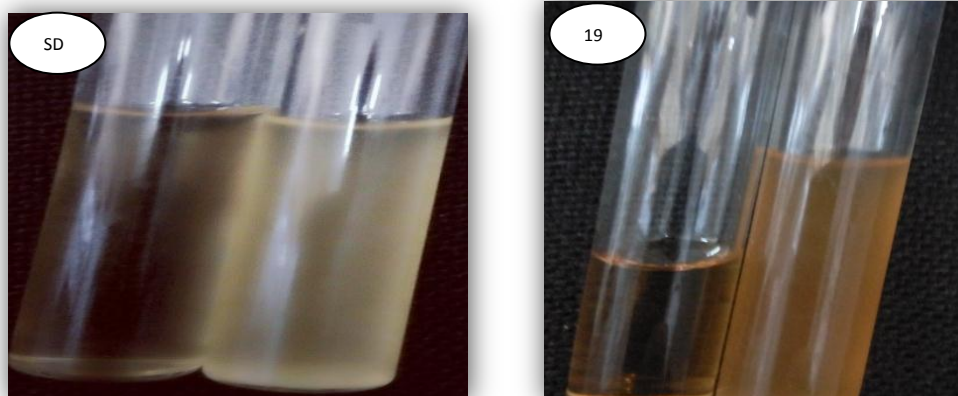


Figure 07: Aspect macroscopique des bactéries lactiques, en milieu (MRS, M17) liquide

SD17 : *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis*.

19D : *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*.

-Sur milieu solide : des colonies lenticulaires parfois circulaires de petites tailles, blanchâtres ou légèrement jaunâtres, à pourtours réguliers et lisses (Voir figure 08).

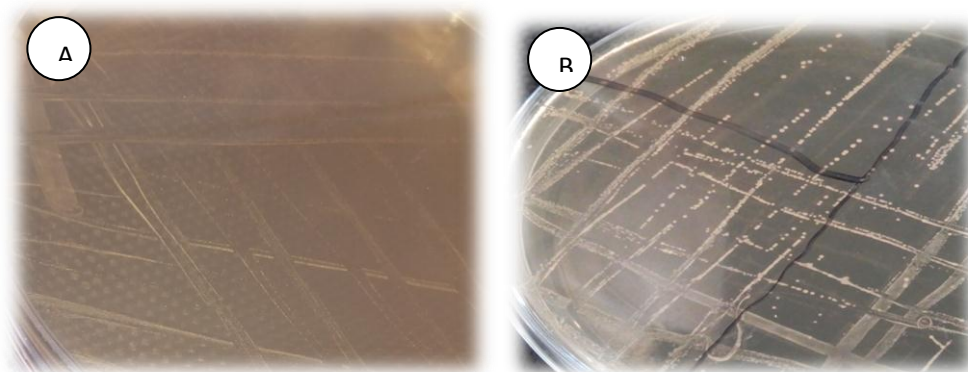


Figure 08: Aspect colonies des bactéries lactiques obtenues après 24 h d'incubation à 30°C sur milieu solide

A : *Leuconostoc mesentroides*ensemencée sur milieu MRS

B : *Lactococcus diacetylactis*ensemencée sur milieu MRS

1-1-2.Caractérisation microscopique

L'observation après la coloration de Gram des frottis réalisés à partir des colonies microscopique apparues, révèle que les souches (S17, 19D) sont à Gram positif, de forme identique (coque), disposées en paires (diplocoques) ou en courtes chainettes (Voir figure 09). Nos résultats concordent avec les caractéristiques de ces deux souches rapportées par les auteurs (**Badis et al., 2005**)

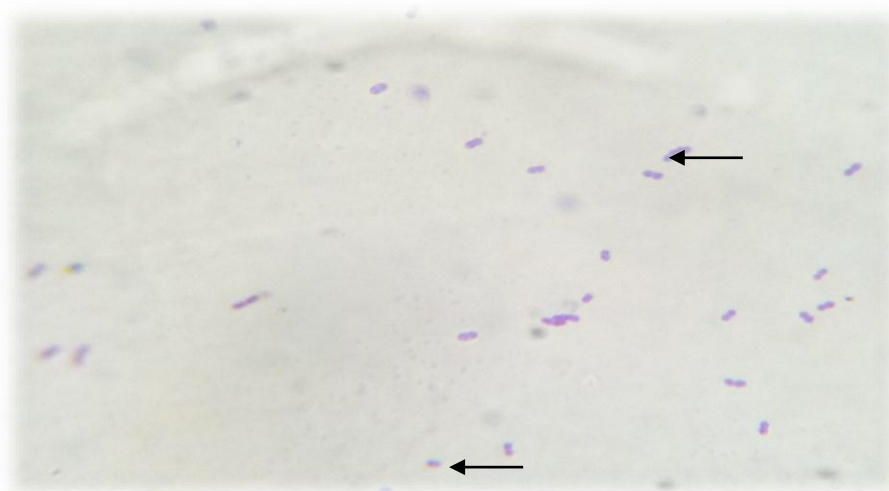


Figure 09: Aspect microscopique et arrangement des bactéries lactiques après coloration de Gram, (agrandissement x 100)

1-2 .Etude biochimique

1-2-1.Test de catalase

Dans l'essai du test catalase on a remarqué l'absence de dégagement des gaz, signifiant alors l'absence de l'enzyme catalase (voir figure 10), ou souches catalase négative. Ces résultats ont été démontrés par **kihal et al., (2009)**.

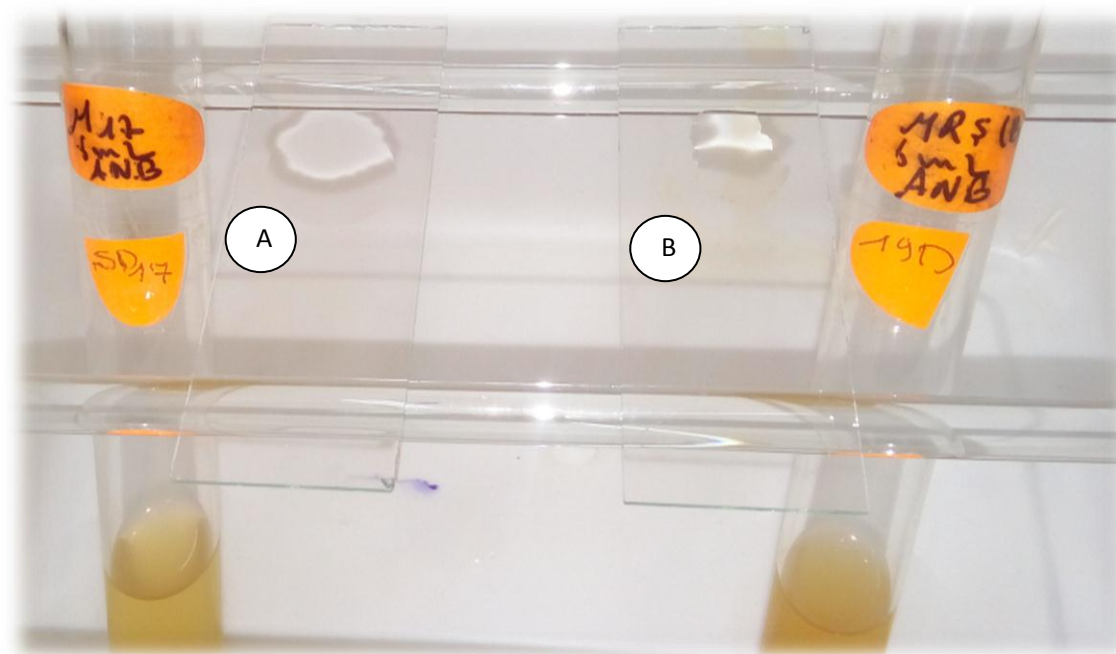


Figure 10:Test catalase

A :*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

B :*Leuconostoc mesenteroides* subsp.*mesenteroides*.

1-3.Le type fermentaire

Pour déterminer les différents types fermentaires nous avons fait un test pour les deux souches étudiées (*Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*) prises séparément.

Notre résultat montre que la souche *Lactococcus diacetylactis* (SD17) est homofermentaire, puisque nous avons eu l'absence des bulles de gaz dans la cloche de Durham, par contre la souche *Leuconostoc mesenteroides* (19D) est hétérofermentaire, car nous avons observé un dégagement gazeux (voir figure 11).

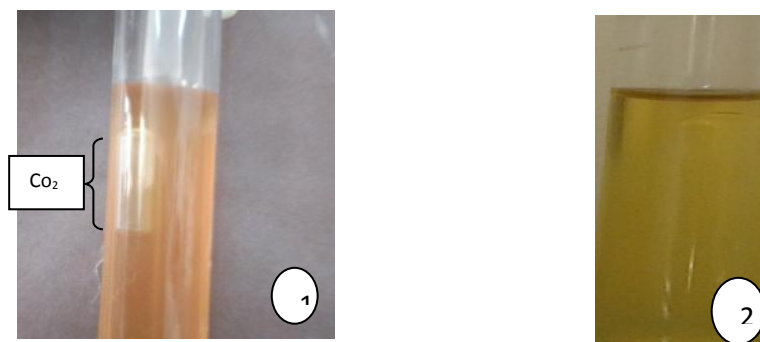


Figure 11 : type fermentaire des ferments lactiques (*Lactococcus* et *Leuconostoc*)

1 : *Leuconostoc mesenteroides*

2 : *Lactococcus diacetylactis*

2- Paramètres physico-chimiques du lait

Dans le tableau 04, sont indiquées les valeurs des paramètres physico-chimiques étudiés sur le lait reconstitué à partir du lait entier en poudre « Celia ».

Tableau 04: paramètres physico-chimiques du lait

pH	6 ,5
Acidité (°D)	20
Densité	1 ,028

2-1.pH

Les résultats obtenus dans le tableau 01 montrent que le pH de lait est égal à 6,5. Notre résultat est comparable au résultat de **Karsten (1937)** qui se situent dans l'intervalle de 6,4 à 6,6, et aussi avec le résultat de **Labioui et al.,(2009)** qui se situent dans l'intervalle de 6,44 à 6,71 avec une moyenne de 6 ,55.

2-2.Acidité

D'après les résultats présentés dans le tableau 01 l'acidité titrable du lait (Celia) est 20 °D, notre résultat concorde au résultat de **Tir et al.,(2015)**.

2-3.Densité

Dans le tableau 01, la valeur de la densité corrigée du lait analysé est égale à 1,028, cette valeur est comprise dans l'intervalle 1 ,028-1,033 et 1,024-1,032 cités par **Labioui et al.,(2009)**

Nos résultats sont proches de ceux trouvés par **Kopaczewski (1948)** qui sont 1,031. Selon **Labioui et al.,(2009)**, la densité dépend de la teneur en matière grasse, de l'augmentation de la température et des disponibilités alimentaires.

3-Cinétique de croissance

Les figures 12, 13 et 14 représentent respectivement l'évolution du pH, l'acidité Dornic et de la croissance des souches (19D, SD17) en fonction du temps.

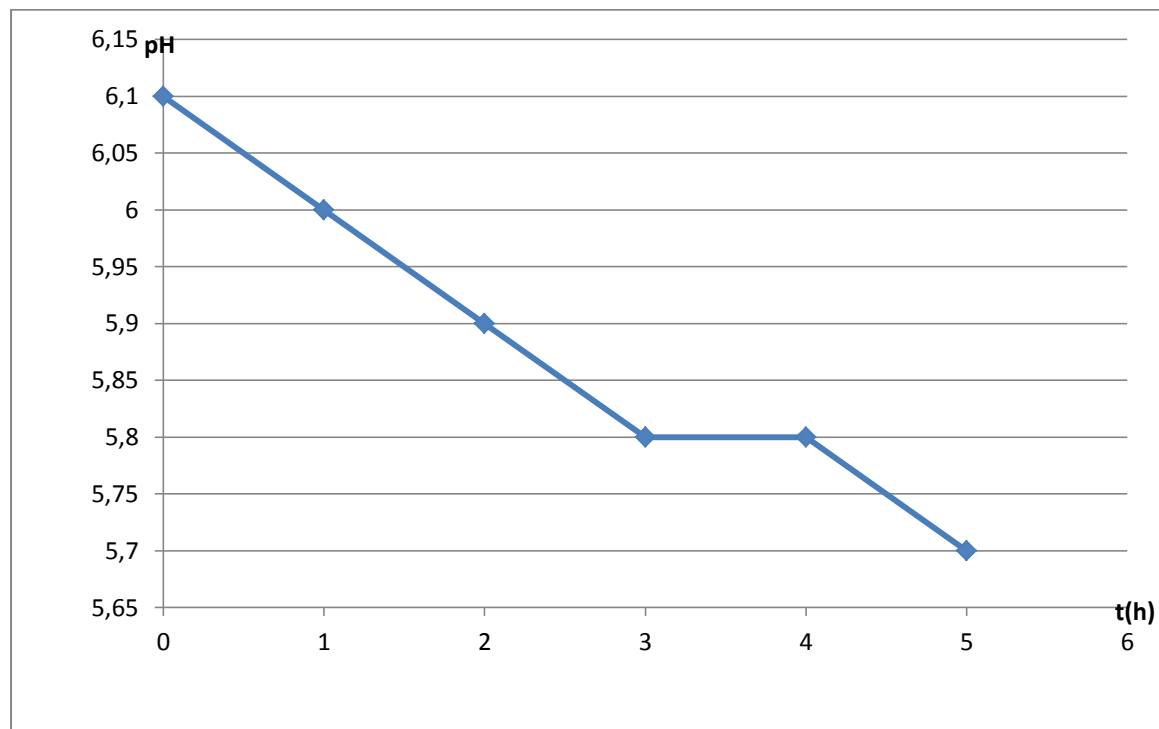


Figure 12 : Variation de pH des souches (19D et SD17) cultivées sur milieu lait à 30°C

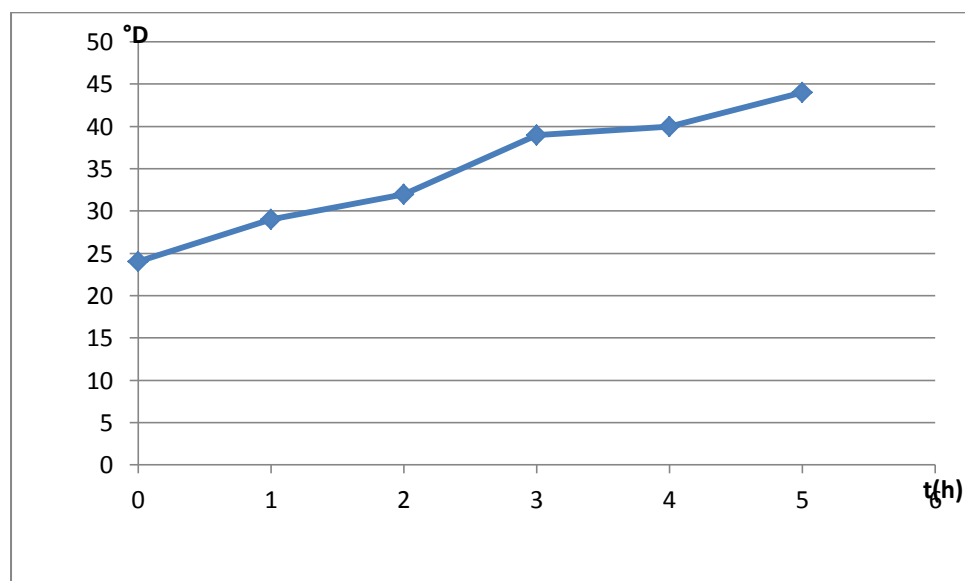


Figure 13: Variation de l'acidité des souches (19D et SD17) cultivées sur milieu lait à 30°C

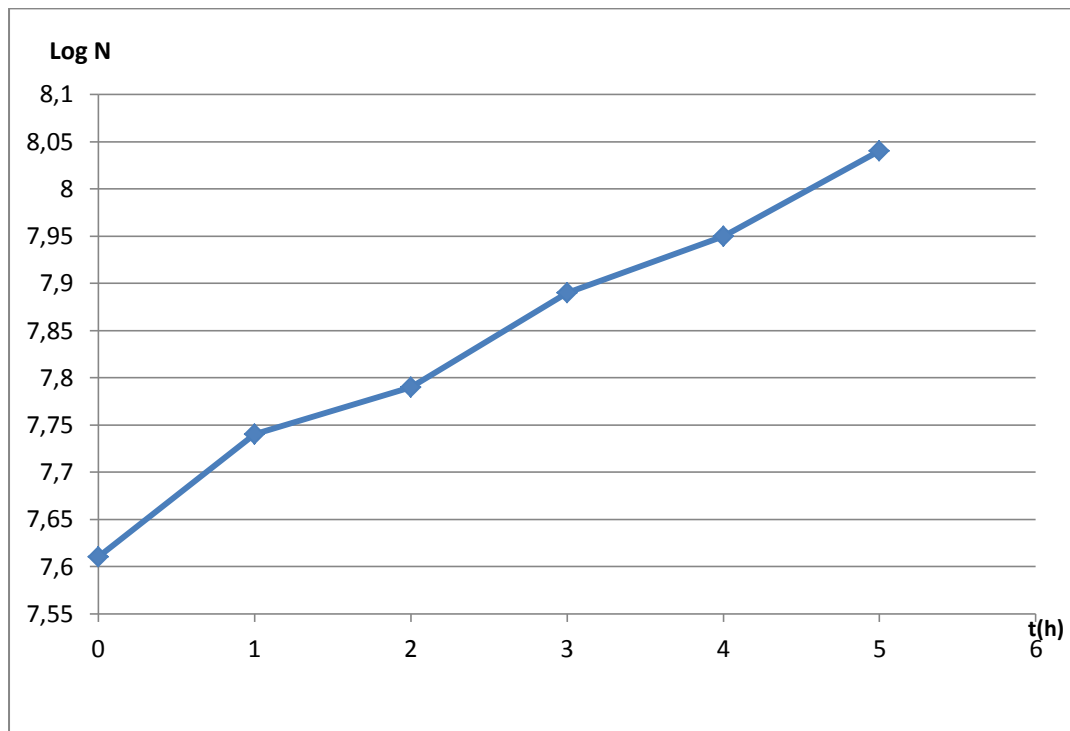


Figure 14: Cinétique de croissance des souches (19 D et SD17) Cultivées sur milieu lait à 30°C

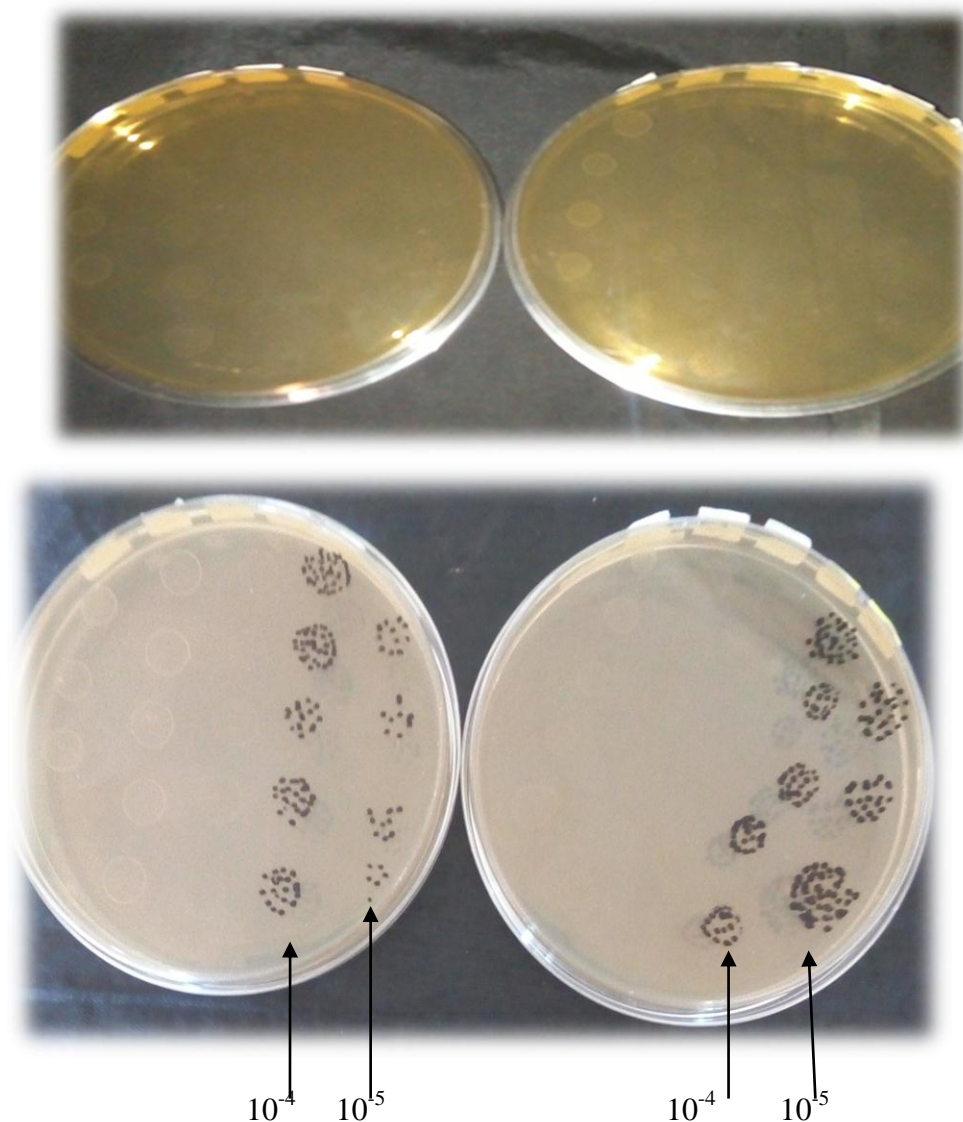


Figure 15 : Boite de pétri contenant la gélose MRS au sein des quelles sont déposées des suspensions bactériennes à différentes dilutions (de 10^{-1} à 10^{-6}) après incubation à 30°C pendant 24 heures.

3-1 pH

On remarque dans la figure 06, une diminution du pH du lait (ensemencé) de 6,1 à 5,7 durant les 05 heures d'incubation, ceci est dû à la présence des ferments lactiques (19D, SD17). Cependant, il y a eu un palier entre 3 et 4 heures, probablement dû à une erreur de lecture du pH.

3-2 L'acidité

La figure 07 montre une augmentation de l'acidité Dornic du lait (ensemencé) de 24 à 44. Cette évolution de l'acidité est un indicateur de la croissance bactérienne. Le lait reconstitué avant incubation a une acidité Dornic de 24 °D et après 5 h

d'incubation, l'acidité a atteint 44°D, Nos résultats sont proches de ceux trouvés par **Moulay et al.,(2006)** et qui sont de l'ordre de 51°D.

Selon **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. La comparaison entre les graphes du pH et celui de l'acidité montre que le taux de l'acidité augmente avec la diminution du pH.

3-3.Cinétique de croissance

A partir de la courbe de la figure 08, nous constatons une évolution de la croissance des souches pendant 5 heures de fermentation ce qui nous a permis de distinguer les différentes phases de croissance de ces bactéries. On remarque que :

_Absence de la phase de latence

_Une phase d'accélération

_Une phase d'exponentielle

D'après ces courbes il semble avoir une seule phase probablement la phase exponentielle

4. Paramètres physico-chimiques du fromage

Les résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur le fromage préparé à partir du lait entier en poudre (Celia) figurent dans le tableau 05 ;

Tableau 05 : Résultats des analyses physico-chimique du fromage

PH	Acidité	Rendement	
		R _{F1}	R _{F2}
5	120	34,5%	30,33 %

4 .1.pH de fromage

Le pH, très variable d'un fromage à l'autre au démoulage et l'intérieur du fromage, est un facteur de sélection prépondérant. La zone critique se situe entre 4,5 et 5,2 pour l'inhibition microbienne. Cependant, de nombreux micro-organismes, dont les champignons, peuvent se développer à des pH inférieurs. De plus, Le pH change au

cours du temps, en surface et en profondeur du fromage, entraînant des changements progressifs de flore. (Vandeweghe, 1997).

Le résultat de pH du fromage est de 05 (tableau 02) ; cette valeur se situe dans l'intervalle 4,3 à 5,0 cité par Hamama et al., (1995)

4.2. Acidité titrable

La valeur d'acidité Dornic du fromage trouvée 120 est très Proche de celle trouvée par Moulay (2014) qui est de l'ordre de 115 °D.

Le PH et l'acidité dépendent de la teneur en caséine, en sels minéraux et en ions (Tir et al., 2015 ; Labioui et al., 2009)

4.3. Rendement

Dans tableau 05, On remarque que le rendement fromager est de 34,5% après le premier égouttage, Mais après le deuxième égouttage le rendement fromager est 30,33%. Par contre l'étude réalisée par Bachir bouiadjra et al.,(2016), sur les deux bactéries lactiques et enzyme libèrent, donne un rendement d'environ 19,56%

5. Caractérisation d'enzyme utilisée

Les caractéristiques de l'enzyme utilisée sont regroupées dans le tableau 07

Tableau 07 : caractérisation des enzymes utilisés

Les paramètres	Chymosine libre	chymosine Fixée
Temps de floculation (sec) (30°)	420	210
Temps de coagulation (min)	29	26
Activité coagulante UAC/ml	0,238	0,47
Force de coagulation	$\frac{1}{13,79}$	$\frac{1}{15,38}$

5-1.Temps de floculation

Nous pouvons remarquer que la chymosine libre, donne un temps de floculation à 30°C d'environ 420sec. La chymosine fixée donne un temps de floculation d'environ 210sec.et on remarque que le temps de floculation de la chymosine libre est 02 fois le temps de la chymosine fixée. Par contre l'étude présentée par Marchadi et al., (2016), donne un temps de floculation d'environ 191 .

5-2 .Temps de coagulation

On remarque que la chymosine libre, donne un temps de coagulation d'environ 29min. La chymosine fixée donne un temps de coagulation d'environ 26 min.

5-3. Activité coagulante

L'unité d'activité coagulante (U. A. C) qui représente la quantité d'enzyme contenue dans 1ml de la solution enzymatique, qui peut coaguler 10ml de lait en 100sec à 30°C, est de 0,238 unité/ml pour la chymosine libre et 0,47unité/ml pour la chymosine fixée. Ce résultat est différent à celui obtenu par **Merchadi et al., (2016)**, déminué à 18 .75 unité /ml

5-4.Force de coagulation

La chymosine libre a une force coagulante de 1/13.79 Par contre la force de Chymosine fixée est de 1 / 15 .38

6. Caractéristiques sensorielles

Les caractères organoleptiques d'un aliment déterminent l'attrait qu'il exerce sur le consommateur. L'aspect d'un fromage, sa consistance et sa flaveur, de l'odorat du toucher et du goût. Cet examen doit permettre de caractériser le produit de façon qualitative et quantitative pour permettre d'établir des classements, des comparaisons entre les échantillons (Eck, 1987).

Tableau 06 : Evaluation sensorielle des fromages frais préparés

Caractère étudié	Echantillon	Fromage
Couleur	Jaunâtre	0%
	Crème	0%
	Jeune claire	0%
	Crème claire	80%
	blanchâtre	20%
Aspect	Sec	0%
	Hydratant	0%
	Normal	100%
Texture	Ferme	0%
	Granulée	10%
	Souple	90%
	Onctueuse	0%
Gout	Très bon	1%
	Bon	90%
	Moyen	4%
	Acide	0%
	Amères	5%
	Rance	0%
	sale	0%
Odeur	Lait Cru	0%
	Beurre	0%
	Fromage	100%
	L'ben	0%
Le fromage est :	Bon	

Les caractéristiques sensorielles des fromages sont une préoccupation importante. La qualité sensorielle des fromages varie en fonction de la technologie de fabrication et de la caractéristique chimique et microbiologie de la matière première mise en œuvre. Ces dernières dépendent elles même de nombreux facteurs d'origine génétique, physiologique et alimentaires (Moulay, 2014)

La majorité des dégustateurs (80%) estiment que notre fromage est d'une couleur Crème claire, contre 20% estimant que notre fromage est d'une couleur blanchâtre

L'aspect a été jugé à 100% normal, quant à la texture, 90% des dégustateurs ont jugé notre fromage à texture souple, contre 10% des dégustateurs ayant jugé une texture granulée

Pour le goût, la majorité des dégustateurs (90%) ont apprécié le fromage en le jugeant bon

Tous les dégustateurs ont jugé une odeur caractéristique de fromage

Selon Moulay (2014), le goût de la pâte est dû à la diffusion du sel dans celle-ci, donc le NaCl peut avoir une action sur la formation de la flaveur en tant qu'exhausteur d'arôme

Conclusion

Pour fabriquer le fromage frais, nous avons utilisé la chymosine et les ferments lactiques (*Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*) immobilisées par un support solide (argile).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les ferments lactiques ré-identifiés sont Gram positif, de forme identique (coque), disposées en paires (diplocoques) ou en courtes chainettes, catalase négative, homofermentaire pour la souche *Lactococcuse diacetylactis diacetylactis*, hétérofermontaire pour la souche *Leuconostoc mesentroides*

Les paramètres physico-chimiques du lait reconstitué, utilisé dans la fabrication du fromage, et préparé à partir du lait entier en poudre« Celia), sont : Un pH=6,5, acidité 20°D et une densité 1,028.

Les résultats de la cinétique de croissance obtenue par l'évolution de l'acidification, variation du pH et par le nombre de bactéries, montrent que 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 cellule.

La majorité des dégustateurs estiment que le fromage fabriqué est de bonne qualité organoleptique, caractérisé par une couleur crème claire, un aspect normal, une texture souple, un gout bon et une odeur de fromage. Quant au rendement fromager, il est de 34,5% après le premier égouttage, et de 30,33% après un deuxième égouttage effectué après le salage.

L'immobilisation des ferments [9ml suspension bactérienne +1 ml argile (1g/l)] et de l'enzyme [9 ml (70g/ l) + 1 ml argile (1g/l)] peut constituer une base solide pour des travaux futurs pouvant être extrapolés aux procédés industriels.

- Adoui F. 2007.** Extraction d'enzyme coagulant le lait à partir de pro ventricules de poulet. Mémoire de magister. Université MENTOURI : Instit de la Nutrition de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires. p39.
- Bachir Bouiadjara Y., Riah S et Smaili K. 2015 .**Essai de fabrication du fromage frais par coagulation mixte (levains lactiques et présure). Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de la vie .p58 .
- Badis A., Laouabria- Sellami N., Guetarni D., Kihal M et Ouzrout R. 2005.** Caractirisation phenotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre du deux populations caprines locales 'arabia et kabyle'.Sciences & Technologie.23. Pp 30-37.
- Bection, Dickinson and Company .2005.**Standard de turbidité préparé BBL 8808421JAA 2005/02 Français.p03.
- Bouchellout 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.
- Bourgeois C.M. et Larpent J.P.1989.** Microbiologie alimentaire. TEC & DOC LAVOISIER. Paris .p334.
- Bourgeois C.M. et Leveau J.Y. 1980 .**Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire .Volume 3 TEC & DOC .France. p331.
- Bourgois C.M. et Larpent P.1996.** Microbiologie alimentaire Tome 2 Aliments fermentées et fermentation alimentaires. 2^{ème} édition TEC & DOC. Paris .p523.
- Bulard E. 2012.** L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire .thèse de doctorat .Université Pris Sud-Paris. p185.
- Burstein C. 2000 .**Biotechnologie Enzymatique Mode d'emploi. ECONOMICA.Paris. p110.
- Cantin M.2013.** Guide de l'amateur de fromages. ALBIN MICHEL. Paris .p317.
- Cayot P. et Porient D. 1998.** Structures et technofonctions des protéines du lait. ARILAIT RECHERCHES TEC & DOC LAVOISIER .Paris .p363.
- Clavier B. 2001.** Technologie alimentaire.S.A .Paris .p189 .
- Croguennec T ., Jeantet R et Brulé G. 2008.** Fondements physicochimique de la technique de la technologie laitière .Edition TEC & DOC LAVOISIER .Paris .p161.
- Dalynn. Biologicols. 2014 .**McFarland Standard Catalogue No. TM50-TM60.p02.
- Dellaras C. 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou des contrôle sanitaire Edition TEC&DOC, Paris, p476.

- ECK A. et Gillis J.C .1997 .**Le Fromage. 3^{ème} Edition TEC & DOC. Pris. p891.
- Eck A.1987.** Le fromage. 2^{ème} édition Lavoisier TEC & DOC .Paris .p531.
- Federighi M. 2005.** Bactériologie alimentaire .2^{ème} édition ECONOMOCA .Paris 292.
- Fredot M.2005.** Bactériologie alimentaire .ECONOMICA.Paris.p292.
- Fredot E.2009.** Connaissance des aliments .Editions TEC & DOC .Now York .p 397.
- Guetouache M., Guessas B., Medjekal S et Toumatia O.2015.** Technological and Biochemical characterization of Lactic Acid Bacteria isolated from Algerian Traditional Dairy Products. 3(2) : 234-241.
- Guiraud J.P.1998 .**Microbiologie alimentaire .Dunod. p652.
- Hamama A ., Zohar M et Marrakchi A. 1995.**Préparation du fromage frais à partir du lait recombiné. Actes Inst Agron Vet. Pp21-26.
- Jarrar H.2011.**Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles.These de doctorat .Ecole Nationale Supérieure de Chimie De Montpellier .Institut Européen des Membranes de Montpellier. p165.
- Jeanet R., Croguennec T., Schuck P., Brulé G .2007.** Sciences des aliments Biochimie, Microbiologie, Procédés, Produits .Editions TEC & DOC, Paris, p456.
- Jeanet R ., Croguennec T ., Mohaut M ., Schuck P et Brulé G. 2008.** Les produits laitiers. 2^{ème} édition TEC & DOC LAVOISIER .Paris . p185.
- Joffin C. et Joffin J.N.2010.** Microbiologie alimentaire. 6^{ème} édition SCEREN [CNDP – CRDP],p344.
- Joffin J.N. et Leyral G. 2006 .**Microbiologie technique. 4^{ème} édition SCEREN CRDP AQUITAINE, Espagne, p363.
- Kihal M. et Diviés C.2009.** Carbon dioxide production by leuconostoc mesenteroides groiun in single and mixed culture with Lactococcus lactis in skim milk, scientific research and essay vol. 4(11). Pp 1348-1353.
- Kopaczewski W ,1948 .**Etude physico-chimique du lait. hal-00927959.Pp 114-141.
- Korsten A.1937.**La mesure du pH au service du lait et des produits laitiers .Applications nouvelle en Allemagne.'hal -00895297 '.pp 918-927
- Kouniba A ., Berrada M et Marakchi. 2007.** Etude comparative de la composition chimique du lait de chèvre de la rase locale marocaine et la race alpine et évaluation de leur aptitude fromagère .Méd. Vét. Pp152-160.

- Labioui H., Laarousi E., Benzakour A., El yachoui m., Berny E et Ouhssine M. 2009.** Etude physicochimique et microbiologique de lais crus. Bull Soc Pharn Bordeaux.148. Pp 7-16.
- Larpent J .P. 1997.**Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire .Edition TEC&DOC. Paris. p1073.
- Larpent J.P ., 2005 .**Microbiologie alimentaire de laboratiore. TEC& DOC. Paris. p1073.
- Luquet F. M. 1990 .**Laits et produit laitiers vache. Brebis. chèvre. 2^{ème} Edition TEC & DOC. LAVOISIER. Paris. p637.
- Mathieu J. 1998.**Initiation à la physicochimie du lait. TEC & DOC. Paris .p220.
- Merchadi F.Z.Gharbi M et Tayebia F.2016.**Essai de fabrication de fromage frais par coagulation enzymatique. Mémoire de master.Univarsité Ibn khaldoun .Tiaret. P38.
- Moulay M., Aggad H., Benmechernene Z ., Guessas B., Henni D .E et Rihal M .,2006.** Cultivable lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Rau Goat smilk and their proteolytic activity world journal of dairy food science. 1(1) : 12-18.
- 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 doctoret. Université d'Oran . p138.
- 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 7(6): 999-1007.
- Robitaille V. et Tremblay D. 1997.** Mécanique des sols théorie et pratique .Edition MODULO .Canada .Pp 79-113.
- Roche J. 2011.** Régénération continue du facteur NADH catalysée par la formate déshydrogénase immobilisée en réacteur filtre-presse. Thèse de doctorat. Université de toulouse. Paul sabatier, p170.
- Roger V.1975.** Technologie du lait. LAMAISON RUSTIQUE .Paris . p709.
- Senouci B .M .et Abdelouahid D. E. 2010.** Méthodes et techniques en bactériologie OFFICE DES PUBLICATIONS UNIVERSITAIRES, Alger, p 131.
- Tiffour H., Cheikh S et Karfas F.2014.** Effet de complexe argile de maghnia / bactérie lactique (*Lactococcus diacetylactis*) sur le rendement et la qualité des fromages frais. U niversité Ibn khaldoun. Tiaret p 32.
- Tir E .,Bounoua S ., Heddar M et Bouklila N. 2015.** Etude de qualité physico-chimique et microbiologique de lait crus de vache dans deux fermes de la wilaya de tissemsilt (Algérie). Elwahat pour les recherches et les etude. Pp 26-33.

Trémolières J., Serville Y., Jacquot R et Dupin H.1980. Les aliments. Tome 2 .8^{ème}
Edition E.S.F.France. p516.

Vaillant M.E.1936.Observation pratiques sur le rendement en fromagie. Le lait INRA
Editions .16(154) .Pp360-383.

Werner J.B., Badoud R ., Loliger J. et Etournaud A. 2010.Science et technologie des
aliments. PRESSES POLYTECHNIQUES ET UNIVERSITAIRES ROMANDES. Italie.p
720.

Annexe 03

Composition des milieux de culture

Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe)

- Peptone 10g
- Extrait de viande 10g
- Extrait de levure 5g
- Glucose 20g
- Tween 80 (polysorbate 80) 1 ml
- Phosphate dipotassique 2g
- Acétate de sodium 5g
- Citrate traimmonique 2g
- Sulfate de magnésium 200mg
- Sulfate de manganèse 50mg

pH 6.5. Répartir en tubes à essais (8 à 10ml) Autoclaver 15 minutes à 120°C. Ce milieu peut être préparé à double concentration en multipliant par deux les valeurs ci-dessus.

Gélose MRS

Composition de Bouillon MRS + 10g Agar(en gramme par litre d'eau distillée)

Bouillon M17 (Oxoid ou Merck) (g/l)

Glycérophosphate de sodium	19
Peptone de soja	5
Extrait de viande	5
Lactose	5
Peptone de viande	2.5
Peptone de caséine	2.5
Extrait de levure	2.5
Acide ascorbique	0.5
Sulfate de magnésium	0.25

Stérilisation 15 minutes à 110°C .

Lait écrémé

Lait écrémé	10g
Extrait de levure	0.5g
Eau distillée	100ml

pH =7 Autoclavage à 110 pendant 10 minutes

Annexe 02

La présure industrielle (chymosine en poudre)

CHR HANSEN

CHY-MAX® Poudre NB

Fiche Information Produit
Coagulant en poudre

Description :

CHY-MAX® Poudre NB est une solution standardisée de chymosine pure produite par fermentation de *Aspergillus niger* var. *awamori*. CHY-MAX® Poudre NB ne contient pas d'amylases à un niveau détectable. (Méthodes utilisées: Glucoamylase AP-021 et Amylase AP-20). La version poudre de CHY-MAX® est formulée sans benzoate.

CHY-MAX® Poudre NB est composée d'enzymes coagulantes du lait spécifique de l'hydrolyse de la caséine Kappa, donnant ainsi une très bonne formation du caillé. L'activité protéolytique générale a également un impact significatif sur la formation de la saveur et de la texture des fromages.

CHY-MAX® Poudre NB est conforme aux recommandations du JECFA (FAO/WHO) et du FCC concernant les enzymes alimentaires, et à celles émises par le SCF (Scientific Committee on Food) de l'Union Européenne sur la préparation des enzymes alimentaires.

Les coagulants de Chr. Hansen sont produits en stricte conformité avec la réglementation danoise et les autres autorités sanitaires pour la production d'enzymes destinées à l'alimentaire humaine. Les références CHY-MAX® Poudre NB sont certifiées Halal.

Aspect :

CHY-MAX® Poudre NB est une poudre blanche à jaunâtre avec une odeur caractéristique. Des variations de couleur peuvent être observées ce qui n'a aucune incidence sur l'activité coagulante.

Composition enzymatique :

L'activité enzymatique du produit est uniquement due à la chymosine. (EC 3.4.23.4).

La gamme de produits :

La gamme CHY-MAX® Poudre NB comporte les références suivantes :

Référence	Code	Chymosine %	Activité moyenne (IMCU/g)	Force minimum à DLUO (IMCU/g)	Note
CHY-MAX® Plus NB	1424	100	1400	1300	Kosher, Halal
CHY-MAX® Extra NB	1425	100	2235	2080	Kosher, Halal

L'activité moyenne en IMCU/g (International Milk Clotting Units) est mesurée selon la méthode standard ISO 11815/IDF 157.

JPPs/Fiche Information Produit/CHY-MAX® Poudre NB/Mai 2010/ 1-4

Chr. Hansen SAS - Route d'Aulnay BP64 - 91292 ArpaJon Cedex FRANCE - Tél. +33 1 69 88 36 36 - Fax: +33 1 60 84 15 94
www.chr-hansen.com

Les données contenues dans ce présent fiche peuvent être sujettes à des variations et sont données à titre indicatif. Ces données peuvent être révisées sans préavis. Ces informations sont soumises à nos conditions d'utilisation. Copyright 2008 Chr. Hansen S.A. Tous droits réservés.

Figure 02: La présure industrielle (chymosine en poudre)

Annexe 04

Coloration de Gram

Principe :

Elle est déroulée en trois temps principaux :

-le frottis, séché et fixé, est recouvert de violet de gentiane, toutes les bactéries prennent ce colorant .on recouvre alors de réactif de lugol qui joue le rôle de mordant ;

-ensuite, le frottis est soumis à l'action de l'éthanol de fraction volumique (90- 95 %
L'éthanol dissolvant le violet de gentiane permet de décoloration de certaines bactéries dites à Gram négatif. Les bactéries à Gram positif restent violettes ;

-après lavage à l'eau, la préparation est recouverte d'un deuxième colorant (safranine ou fuchsine basique phénolées) qui recolore en rose les bactéries précédemment décolorées. Observer après séchage à l'immersion (objectif x100) et à pleine lumière. Une première mise au point peut être faite à l'objectif x10.

Au terme de ce processus, les bactéries à Gram négatif apparaissent roses et les bactéries à Gram positif violettes. Ce sont différences de nature de la paroi qui sont la cause de cette différence de coloration : les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus fine que celles à Gram positif, et, de plus, elles sont riches en lipides (membrane externe de la paroi) dans lesquels l'éthanol est fortement soluble.

Annexe07 :

Evaluation sensorielle de fromage frais préparé

Tableau 01 : Evaluation sensorielle de fromage frais préparé

Caractère étudié		Echantillon	Fromage
Couleur	Jaunâtre		
	Crème		
	Jeune claire		
	Crème claire		
	Blanchâtre		
Aspect	Sec		
	Hydratant		
	Normal		
Texture	Ferme		
	Granulée		
	Souple		
	Onctueuse		
Gout	Très bon		
	Bon		
	Moyen		
	Acide		
	Amères		
	Rance		
	Sale		
Odeur	Lait Cru		
	Beurre		
	Fromage		
	L'ben		
Le fromage est :			

Annexe 01

Le lait en poudre utilisé



Figure 01 : Lait en poudre utilisé

Annexe : 06**Dénombrement des colonies**

D'après **joffin et joffin (2010)**.

Le but des techniques de dénombrement est de déterminer le nombre de microorganismes d'une catégorie donnée contenus dans un volume donné.

Selon **Joffin et Leyral (2006)** :

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0.1 \cdot n_2) \cdot d}$$

Dans laquelle

C = Somme des colonies des boîtes comptées ;

V=Volume de l'inoculum ;

n₁ = nombre boîtes comptées à la plus faible dilution ;

n₂ = nombre boîtes comptées à la plus forte dilution ;

d=dilution correspondant à la plus faible.

Annexe 08

Les résultats d'évolution l'acidité, PH et le nombre de micro –spots UFC/ml

Tableau 02 : les valeurs de l'acidité produit en degré Dornic (°D)

Temps(h)	0	1	2	3	4	5
°D	24	29	32	39	40	44

Tableau 03 : Les valeurs de pH au cours de l'acidification

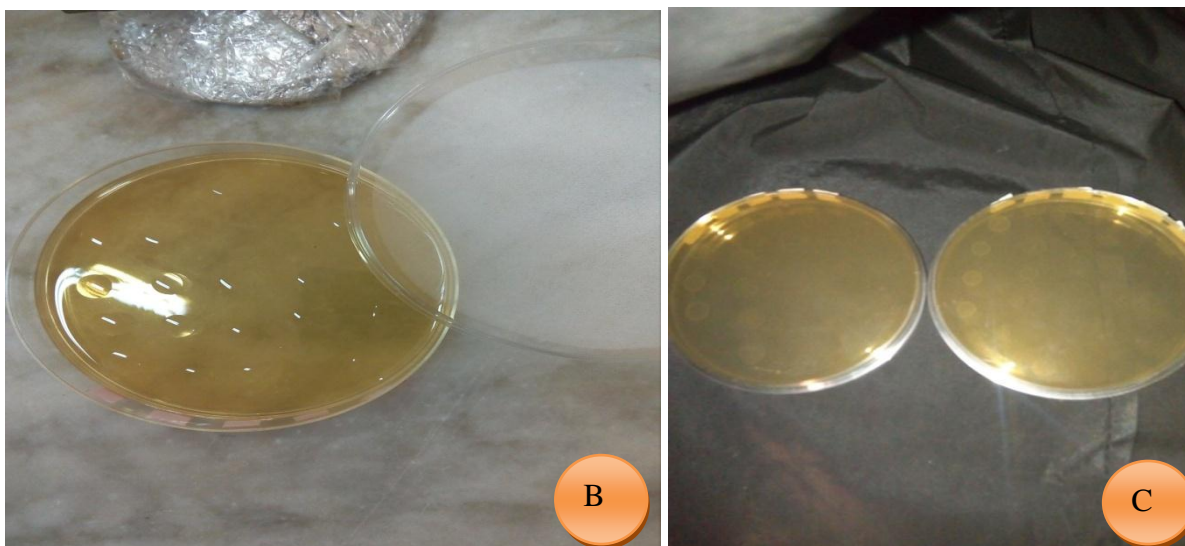
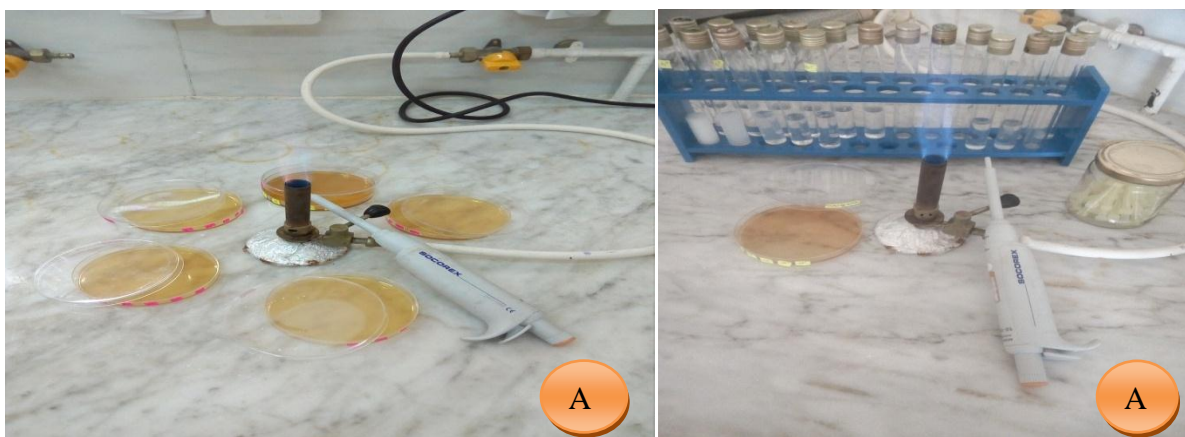
Temps (h)	0	1	2	3	4	5
pH	6.10	6.00	5.90	5.80	5.80	5.70

Tableau 04 : Les valeurs de nombre de micro-spots UFC/ml en fonction de temps

Temps (h)	UFC /ml	Log (UFC /ml)
T₀	4.15 .10⁷	7.61
T₁	5.61 .10⁷	7.74
T₂	6.27 .10⁷	7.79
T₃	7.79.10⁷	7.89
T₄	9.10 .10⁷	7.95
T₅	1.10 .10⁸	8.4

Annexe 09

Technique de micro -spot



Technique de micro-spot

A : les instruments micro-spot

B : micro-spot avant incubation

C : après 24h d'incubation

Annexe : 05**Standardisation à l'échelle de McFarland 5.0****Principe de la méthode**

Les standards de turbidité se préparent en mélangeant des produits chimiques qui précipitent pour former une solution de turbidité reproductible. Les standards McFarland 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 1.5×10^9 Cellules par ml (**B .D.C, 2005 ; DALYNN, 2014**).

McFarland Turbidité standard No. 5.0

Formule approximative par 100ml d'eau purifiée

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

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

D.O. à 625 nm au spectrophotomètre.....0,8-1,0

Cette formule approximative peut être ajustée et/ou enrichie pour des résultats optimaux.

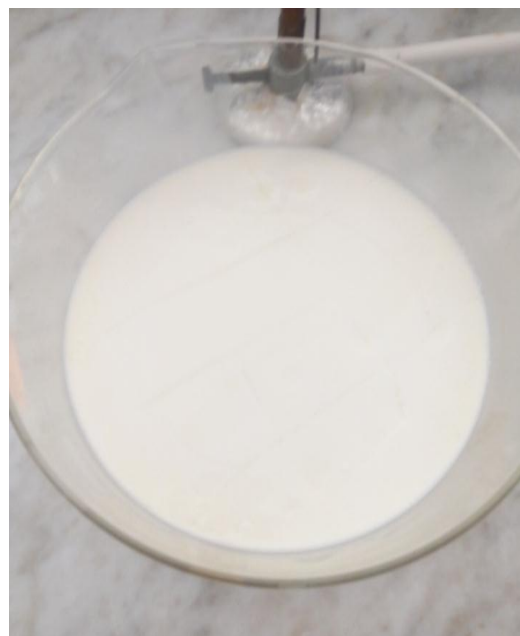
Annexe : 10

Caractérisations organoleptiques et physico-chimiques du fromage

Les photos suivantes montrent les étapes de fabrication du fromage frais



La coagulation du lait après 24h



Tranchage de la pâte



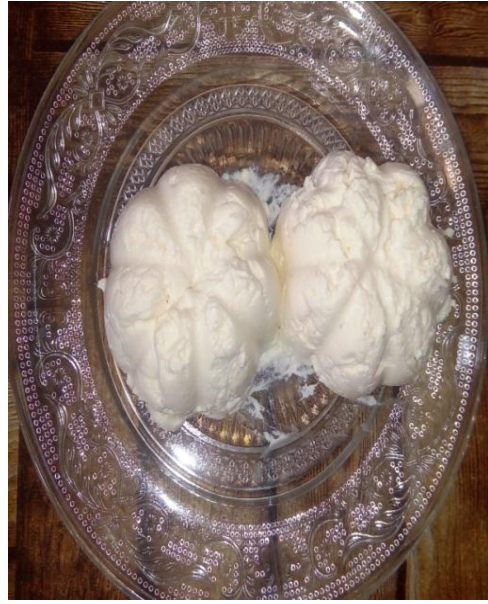
Brassage



Egouttage du caillé



Salage



Moulage

Figure 03 : Les étapes de fabrication du fromage

Résumé

Le travail réalisé dans ce mémoire, a pour objectif la fabrication d'un fromage frais par coagulation mixte (ferment lactique et la chymosine) immobilisés sur support solide (l'argile), à partir du lait reconstitué pasteurisé.

Les ferments lactiques *Lactococcus diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* ont été ré-identifiés par des méthodes microbiologiques, biochimiques, puis fixées sur une suspension d'argile, en suite le culot obtenu est inoculé dans le lait écrémé et incubé à 30°C, Après 24h la pré-culture obtenue est transférée au lait reconstitué. Après 2h, nous avons ajouté, au mélange lait + pré-culture, le culot de chymosine obtenu après fixation sur une suspension d'argile. La cinétique de croissance des souches a été suivie par le pH, l'acidification et le nombre de bactéries en évidence pendant 5h.

Un fromage frais a été obtenu après les étapes de la coagulation, d'égouttage, salage, moulage, suivi par des analyses physico-chimiques et organoleptiques.

L'immobilisation des ferments et de la chymosine sur l'argile a donné lieu à un produit de bonne qualité.

Mots clé : argile, chymosine, Ferments lactique *Lactococcus diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides*.

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحضير جبن طازج بالتخثر المشترك بين الخمائر اللبنية و الكيموزين المثبتين بالصلصال

الخمائر اللبنية *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*

التي ثبتت بالصلصال، تزرع في حليب منزوع الدسم و تحضن في درجة حرارة 30 درجة م لمدة 24 ساعة

الزرع المحصل عليه يضاف إلى كمية من الحليب ويمزج، وبعد ساعتين نضيف له الكيموزين المثبت بالصلصال مسبقا.

نتحصل على جبن طازج بعد عدة مراحل (التخثر، التقطير، التمليح، ثم وضعه في قوالب لأخذ الشكل المعين له، ليتم بعد ذلك تحديد الخصائص الفيزيوكيميائية والحسية .

تثبيت الخمائر اللبنية و الكيموزين بالصلصال يعطي جبن ذو نوعية جيدة

الكلمات المفتاحية : الصلصال، الكيموزين، الخمائر اللبنية *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*