

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE M'HAMEDBOUGARABOUMERDES

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Département : génie de procédé

Filière : génie de procédé

Option : technologie alimentaire

THEME

Comparaison entre deux protéases l'une d'origine microbienne et l'autre d'origine végétale pour application en fromagerie type EDAM

Présenté par : **BOUCETTA Kenza**
KHELFALLAH Nessrine

Soutenu le : 26/06/2018

Jury de soutenance :

Présidente : Mme. ANNOU S.

MAA (UMBB)

Promotrice : Mme. TALANTIKITE S.

MCB (UMBB)

Examinatrice : Mme. Ben Malek N

MAA (UMBB)

Examineur: Mr.Zidani S

MCB (UMBB)

Année universitaire: 2017/2018



Remerciements

Avant tout nous remercions « DIEU » le tout puissant, de nous avoir ouvert les portes du savoir et qui sans lui ce travail ne serait jamais réalisé.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à nos parents pour leur éternel et inconditionnel soutien, toujours présents de notre naissance à ce jour.

*Nos grands remerciements à Madame **Talantikite Souad**, notre encadreur pour sa générosité qu'elle nous apportée et son aide pour avoir dirigé ce travail.*

Notre profonde gratitude aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

*Madame **Annou S** , présidente de ce jury*

*Madame **Ben Malek N** examinatrice*

*Monsieur **Zidani S** examinateur*

Aux enseignants du département génie des procédés particulièrement ceux de la technologie alimentaire, pour leur aide durant notre cursus universitaire sans oublier le personnel de la L.F.B .

Enfin, tous ceux qui de loin comme de près, ont contribué à l'élaboration de ce mémoire qu'ils trouvent ici l'expression de nos sinceres remerciements.

BOUCETTA Kenza

KHELFALLAH Nessrine

De la promotion Master MGA 2017/2018



Dédicace :

J'ai toujours pensé offrir quelque chose à mes parents pour tous ce qu'ils ont consentis comme effort pour me voir réussir, et voilà enfin une occasion tout faite.

Ainsi, je dédie ce travail à mes chers parents Ali et Nassira qui sont la source de mon inspiration et de mon courage, merci papa, merci maman.

A mon frère : Mohamed et

mes sœurs : Mounia, Ahlem, Nawel et son mari Ahmed et ont enfants : Mohamed, Khadidja et Amir

A Ma binôme : KENZA, ainsi que sa famille.

A mes adorables copines : KENZA, Maïssa, Wafa, Faïza, Samah, Nadia, Farida, Amira, Roumaïssa.

A tous les gens qui me connaissent sans exception aucun.

Nessrine



Dédicace :

J'ai toujours pensé offrir quelque chose à mes parents pour tous ce qu'ils ont consentis comme effort pour me voir réussir, et voilà enfin une occasion tout faite.

Ainsi, je dédie ce travail à mes chers parents qui sont la source de mon inspiration et de mon courage, merci papa, merci maman.

A mes frères et mes soeurs

A Ma binôme : Nessrine, ainsi que sa famille.

*A mes adorables copines : Kenza, Maïssa, Wafa, Faïza, Samah,
Nadia, Farida, Amira, Amina, Hakima*

A tous les gens qui me connaissent sans exception aucun.

Kenza

Présentation de l'unité

1 -Description de l'unité :

L'unité de laiterie fromagerie de Boudouaou (L.F.B) appartient au groupe industriel pour production du lait (G.I.P LAIT).cette unité industrielle a commencé sa production en 1978 , sous l'ancienne appellation ONALAIT , elle s'étend sur une superficie de 7 Hectares , elle est située à l'entrer de la ville de Boudouaou dans la Wilaya de Boumerdes à environ 40 kilomètres d'Alger . l'unité est composé de :

- ❖ La laiterie .
- ❖ La fromagerie .
- ❖ Un cave d'affinage et chambres froides de stockage .
- ❖ Les locaux de matières premières.
- ❖ Une station de traitement des eaux .
- ❖ Un laboratoire l'analyses physico-chimique et microbiologique.
- ❖ Un bâtiment administratif .
- ❖ Un bâtiment des services généraux et sociaux .

2- Activité principale :

L'activité principale de la laiterie fromagerie de Boudouaou (L.F.B) est la production et la commercialisation des laits et produits laitiers.

3- Gamme des produits :

- ❖ *L'unité de la laiterie fromagerie de boudouaou assure la production .*
- ❖ *Lait pasteurisé conditionné et lait acidifié fermenté (L'BEN) .*
- ❖ *Fromage fondu pasteurisé : en portions, en barre .*
- ❖ *Fromage pâte pressé non cuit type (EDAM) (boule de 1 kg).*
- ❖ *Lait instantané (sachet de 19 g).*
- ❖ *Fromage fondu stérilisé : boites métallique collectivité de 200g .*

4-Capacité de production :

a-Lait de consommation :

- ❖ *Lait pasteurisé environ 350.000 L/J(en 2 fois 8H).*
- ❖ *L'ben pasteurisé environ 5 .0000L/J.*

b- produits laitiers :

- ❖ *fromage fondu pasteurisé : 6 tonnes /J(en 1 fois 12H).*
- ❖ *Fromage fondu stérilise : 5tonnes / J (en 2 fois 8 H).*
- ❖ *Fromage à pâte pressés type EDAM 2.8 tonnes /j*
- ❖ *Poudre de lait instantané ; 1.5 tonnes /j*

5- Effectif :

L'unité comprend un effectif de 350 personnes.

Sommaire

Sommaire

Introduction	1-2
--------------------	-----

Partie théorique

Chapitre 1 :le lait

1-Généralités :	3
2-Définition :	3
4-Les propriétés physico-chimiques de lait :	4
5-Propriétés nutritionnelles des protéines du lait :	5

Chapitre 2 : la coagulation

1-La caséine :	6
1-1-définition :	6
2- la micelle :	6
2-1- Composition moyenne de la micelle de caséine en g/100g	7
3- la coagulation	8
3-1- définition	8
3-2-Mécanismes de la coagulation :	8
phase primaire :	9
phase secondaire	9
phase tertiaire	9
4- Les facteurs de la coagulation par la présure :	10

Chapitre 3 :les enzymes coagulantes

1- les enzymes coagulants.....	13
1.1-Définition :	13
1-2-La présure	13
2-Propriétés physico-chimiques des succédanés de présure :	14
3- succédanés de la présure :	15

Chapitre 4 : les graines de citrouille

1-Origine de la citrouille (cucurbita pepo l.)	18
2-Description botanique :	18
3-classification :	18
4--constituants principaux des graines de citrouille :	19
5-propriétés des graines de citrouille :	20

Chapitre 5 : les moisissures

Sommaire

Les moisissures :.....	21
1-Définition :	21
2-Structure :	21
3-Conditions de développement :	21
4-Reproduction	22
5- ImportanCe économique des moisissures :	23
6-Production d'enzymes par les moisissures :.....	24
7-Rôles des enzymes en agro-alimentaire :.....	24
8- Caractères physiologiques	25
9-Application en industrie alimentaire :.....	25
Chapitre 6 : le Mucor	
1-Généralités :	26
2-les moisissures les plus utilisées pour les enzymes coagulantes :.....	26
Chapitre 7: la fermentation	
La fermentation :.....	28
1 – Définition :	28
2- Buts de la fermentation :	28
3- Types de fermentation	28
4- les diverses étapes suivies en fermentation solide :	29
5 –Extraction et purification des enzymes :	30
Chapitre 8: le fromage	
1- Définition :	31
2- Variétés des fromages.....	31
3- valeur nutritionnelle des fromages :	33
4-Composition du fromage :	33
Chapitre 9 : transformations du lait en fromage	
1-Technologie de la fabrication d'un fromage :	35
2-standardisation du lait :	35
3- La coagulation :	35
4- l'égouttage :	36
5- le salage :	36
6- l'affinage :	36
7 –Fromage à pâte pressée non cuit type EDAM :	36

Sommaire

Partie expérimentale

Chapitre 10: Matériel et Méthodes

1-Matériel :	42
2-Méthodes :	43
2-1-1-Revivification de la souche <i>Mucor circinelloides</i>	43
2-1-2-Préparation de l'inoculum :	44
2-1-3-Préparation des milieux de fermentation :	44
2-1-4-La fermentation :	44
2-1-5-Extraction d'enzyme coagulante :	45
2-2-1-origine de la matière première :	47
2-2-2-préparation de la matière première :	47
2-2-3-Extraction de système enzymatique :	47
3-Détermination des activités enzymatiques :	50
3-1-1-Préparation du substrat de Berridge :	50
3-1-2-Mesure de l'activité coagulante :	50
3-2-2-La Force de coagulation :	51
4-Dosage des protéines de solutions enzymatiques bruts :	52
5-Caractérisation de l'extrait enzymatique brut :	52
6-Essai de fabrication de fromage type EDAM au niveau de laboratoire de l'unité L.F.B par l'extrait enzymatique (d'origine végétale et l'autre d'origine microbienne) :	53
7- la fabrication.....	54
8- Les Analyses physico –chimiques :	64
9-Analyses microbiologiques :	70

Chapitre 11 :Résultats et discussion

1-Cas microbien : <i>Mucor circinelloides</i>	76
2-Cas du végétal (la graine de citrouille) (<i>cucurbita pepo l.</i>) :	78
3-Estimation de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques bruts de <i>Mucor circinelloides</i> et l'extrait enzymatique brut de graine de citrouille (<i>cucurbita pepo l.</i>) :	80
3-1-1-l'extrait enzymatique brut de <i>Mucor circinelloides</i> (fongique):	82
3-1-2- l'extrait enzymatique brut de la graine de citrouille (<i>cucurbita pepo l.</i>)(Végétale) :	82
4-Dosage des protéines de l'extrait enzymatique brut (fongique et végétal) :	83
5-Caractérisation de l'E.E.B de <i>Mucor circinelloides</i> et de l'E.E.B de la graine de citrouille (<i>cucurbita pepo l.</i>)	84
6-Les analyses physico-chimiques et microbiologiques :	90

Sommaire

6-les analyses physico-chimiques.....	90
7-Les analyses microbiologiques :	93
8-Comparaison entre les deux extraits enzymatiques bruts :	94
9-Comparaison entre les trois pates fromagères :.....	94
Conclusion.....	95-96

Liste des figures

Figure 1: Structure de la micelle de caséine	07
Figure 2 : Un thalle de <i>Mucor pusillus</i> avec des spores.....	27
Figure 3 : Technologie de la fabrication d'un fromage.....	35
Figure 4: Diagramme de fabrication du fromage à pâte pressée non cuite« EDAM» au niveau de la L.F.B.....	40
Figure 5 : <i>Mucor circinelloides</i>	43
Figure 6 : obtention de l'extrait enzymatique brut (E.E.B).....	46
Figure 7 : les principales étapes de l'extraction du système enzymatique brut de graines de citrouille.....	49
Figure 8 ; Pasteurisation de lait.....	54
Figure 9: L'ensemencement.....	55
Figure 10 : L'emprésurage.....	55
Figure 11 : la coagulation (formation du caillé).....	56
Figure 12 : décaillage du caillé	56
Figure 13 : Brassage du caillé.....	57
Figure 14 : 1 ^{ière} étape de délactosage	57
Figure 15 : 2 ^{ième} étape de délactosage	58
Figure 16 : pré pressage	59
Figure 17 : moulage.....	59
Figure 18: pressage	60
Figure 19: démoulage.....	61
Figure 20 : salage.....	61
Figure 21 : affinage.....	62
Figure 22: lavage des boules.....	62

Liste des figures

Figure 23 : grattage des boules	63
Figure 24 : paraffine	63
Figure 25 : conditionnement.....	64
Figure 26 : Aspect macroscopique d'une culture de <i>Mucor circinelloides</i> sur milieu PDA (30°C, 7 jours).....	76
Figure 27 :Fermentation.....	77
Figure 28 : Les résultats de l'activité coagulante à partir d'extrait enzymatique brut (<i>Mucor circinelloides</i>).....	78
Figure 29 : Les résultats de l'activité coagulante à partir d'extrait enzymatique brut la graine de citrouille (<i>cucurbita pepo l.</i>).....	79
Figure 30 : courbe étalon $DO=f[\text{tyrosine}]$ pour la détermination de l'activité protéolytique par la méthode de(Ma Murado et al.,1993).....	81
Figure 31 : courbe étalon $DO=f[\text{B.S.A}]$ pour le dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al,(1951)	83
Figure 32 :l'évolution de l'activité coagulante d'E.E.B de <i>Mucor circinelloides</i> et d'E.E.B de la graine de citrouille en fonction de la température de lait.....	85
Figure33 :l'évolution de l'activité coagulante d'E.E.B de <i>Mucor circinelloides</i> et d'E.E.B de la graine de citrouilleen fonction de pH du lait.....	87
Figure 34 :l'évolution de l'activité coagulante d'E.E.B de <i>Mucor circinelloides</i> et d'E.E.B de la graine decitrouilleen fonction de la concentration de CaCl_2 de lait.....	89

Liste des tableaux

Tableau1 : la composition moyenne du lait de vache	04
Tableau 2 Composition moyenne de la micelle de caséine en g/100g.....	07
Tableau 3 : Origine de différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait.....	12
Tableau 4 : composition moyenne des graines de citrouilles égrainées, non grillées et non salées.....	20
Tableau 5 : Classification des fromages en fonction des opérations de fabrication.....	32
Tableau 6 : Les caractères physico-chimiques de l'EDAM.....	37
Tableau 7 : matériel biologique et non biologique.....	42
Tableau 8 : les résultats de l'activité et de la force coagulante d'extrait enzymatique brut de <i>Mucor circinelloides</i>	77
Tableau 9 l'activité et de la force coagulante des extraits enzymatiques brutes dans le végétal (la graine)	78
Tableau10 : temps de coagulation obtenus avec la solution tampon acétate de sodium et la solution de NaCl.....	80
Tableau11 : les valeurs du courbe étalon DO=f [tyrosine] pour la détermination de l'activité protéolytique.....	81
Tableau 12 : les valeurs du courbe étalon DO=f [tyrosine] et de concentration de l'activité protéolytique d'E.E.B de la graine de citrouille.....	82
Tableau 13 : Préparation des dilutions pour l'élaboration de la courbe étalon de la BSA.....	83
Tableau 14 : résultats obtenu de la Densité optique et la concentration de B.S.A dans l'extrait enzymatique brute de graine de citrouille des différents compartiments	84
Tableau 15 :influence de la température du lait sur l'activité coagulante de la protéase de <i>Mucor circinelloides</i>	84
Tableau 16 :influence de la température du lait sur l'activité coagulante de la protéase de grain de citrouille (<i>cucurbita pepo l.</i>).....	85
Tableau 17 : influence de la pH du lait sur l'activité coagulante de la protéase de <i>Mucor circinelloides</i>	86

Liste des tableaux

Tableau 18 : influence de la pH du lait sur l'activité coagulante de la protéase de la graine de citrouille.....	87
Tableau 19 : influence de la concentration du lait sur l'activité coagulante de la protéase de <i>Mucor circinelloides</i>	88
Tableau 20: influence de la concentration de CaCl ₂ du lait sur l'activité coagulante de la protéase de grain de citrouille.....	89
Tableau 21 : Résultats des analyses physico-chimique du lait	90
Tableau 22 : les résultats des analyses physico-chimique de 1 ^{ère} lactosérum.....	91
Tableau 23 : les résultats des analyses physico-chimique du la 2 ^{ème} lactosérum.....	91
Tableau 24: Résultats des analyses physico-chimiques de l'eau de process.....	92
Tableau 25 : résultats des analyses physicochimique du fromage.....	93
Tableau 26 : Résultats des analyses microbiologique du produit fini.....	93
Tableau 27 : comparaison des résultats entre les deux protéases (fongique et végétale)...	94

Liste des abréviations

Liste des abréviations

Abs : absence.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

a_w : activité de l'eau.

AC:Activité Coagulante.

AP:Activité Protéolytique.

ATP : Adénosine -5- Triphosphate .

BSA:Bovine sérum albumine.

CMP:Caseinomacropéptide.

CaCl₂ : Chlorure de Calcium.

DO:Densité Optique.

°D:Degré Doronic.

L.F.B : la laiterie fromage de Boudouaou.

ED : eau distillée.

EEB:Extrait Enzymatique Brut.

EST : extrait sec total .

MM: Masse Moléculaire.

MG : matière grasse .

OMS : organisation Mondiale de la Santé.

PDA : Potates Dextrose Agar.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

pHi:pH isoélectrique.

Tyr : tyrosine.

Liste des abréviations

TCA: Acide TrichloroAcétique.

UI: unité internationale.

UP: unité présure.

US: unité soxhlet.

Introduction

La transformation du lait en fromage nécessite l'emploi d'un agent coagulant, appelé présure, traditionnellement obtenu de la caillette de veau avant sevrage.

L'industrie fromagère a connu depuis de nombreuses années, une diminution des approvisionnements en présure, cette pénurie a conduit de nombreux chercheurs à exploiter d'autres sources potentielles de coagulases capables de remplacer la présure commerciale.

Beaucoup d'enzymes protéolytiques induisent la coagulation du lait, mais l'importance de ces protéases ne résulte pas seulement de leurs capacités à coaguler le lait, mais aussi du rapport entre capacité de coagulation du lait et de l'activité protéolytique que l'enzyme peut produire.

Ces protéases de diverses origines, sont différentes dans leurs propriétés catalytiques et physiques, mais aussi pour une enzyme donnée son application convenable pour un usage industriel particulier, dépend de plusieurs facteurs.

Parmi les voies de substitution de la présure, la production d'enzymes coagulant le lait à partir de la culture microbienne, suscite un intérêt pour la fromagerie locale et dans le monde où plusieurs souches de microorganismes font l'objet de productions industrielles de protéases coagulantes. En Algérie, où quelques rares fromageries existent, la source de protéase coagulant le lait est certainement *Aspergillus niger* var. *awamori*, une enzyme transgénique réglementée dans notre pays qui produit 100% de chymosine. Des études comparatives de cette enzyme avec la chymosine ont indiqué de grandes similarités dans le mécanisme de la coagulation du lait et plusieurs variétés de fromages préparées avec cet extrait sont semblables à ceux obtenus avec la présure traditionnelle.

Ainsi, cette situation a suscité la recherche de produits de remplacement de la présure susceptibles de remplir un certain nombre de conditions dont les principales sont l'obtention de produits fromagers comparables à ceux de la présure de veau, garantit d'hygiène et de non toxicité et un prix de revient inférieur à celui de la présure.

Depuis le développement de la microbiologie et de l'industrie dans le monde, de nombreuses substances dont les enzymes trouvent de nombreuses applications dans des secteurs industriels variés.

L'Algérie demeure dépendante des laboratoires étrangers fournisseurs de présure, d'où l'intérêt de rechercher des sources locales de production d'enzymes coagulantes

Introduction

Les chercheurs s'intéressèrent de plus en plus à l'étude des extraits coagulants d'origine végétale dont les principaux avantages sont la disponibilité du matériel végétal et la forte Stabilité de leurs coagulases à la chaleur.

Dans notre recherche nous avons étudié une nouvelle source d'enzyme coagulant le lait d'origine végétale qui sont les graines de citrouille (*cucurbita pepo l.*), L'intérêt suscité par cette plante réside dans sa grande répartition en Algérie surtout .sa grande popularité en période estivale.

L'utilisation de cette enzyme en industrie fromagère constituerait une nouvelle source d'obtention d'enzyme coagulant le lait à partir d'une matière première non exploitée jusque-là (**Mouzali ,2001**).

Dans cette optique, nous avons étudié la possibilité d'obtention de protéases coagulant le lait produites à partir d'une souche fongique et végétale .Il s'agit de *Mucor circinelloides* et des graines de citrouille.

Notre étude comporte plusieurs étapes :

1-pour le fongique :

- culture de la souche.
- Fermentation.
- extraction d'enzyme.

2-pour le végétal :

- préparer matière première.
- lavage de matière première.
- sécher les graines.
- broyage pour l'obtention des extraits farineux.
- extraction d'enzyme.

Et pour les deux :

- Etudier les activités coagulantes et protéolytiques ainsi que le taux de protéine.
- étudier les caractéristiques de ces extraits enzymatiques bruts et utilisation de ces extraits dans la fabrication des fromages type « *EDAM* ».

1-Généralités :

Le lait défini comme le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée .il doit être en outre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présenter toutes les garanties sanitaires, il peut être commercialisé en l'état mais le plus souvent après avoir subi des traitements de standardisation lipidique et d'épuration microbienne pour limiter les risques hygiéniques et assurer une plus longue conservation.

L'évolution des processus technologiques, des techniques de conservation et de distribution a permis l'élaboration d'une large gamme de laits de consommation qui se distinguent par leur composition, leur qualité nutritionnelle et organoleptique et leur durée de conservation. (**La voisier, 2008**).

2-Définition :

Le lait est un édifice physico-chimique extrêmement complexe qui contient des trésors de richesses nutritionnelles articulés autour de quatre nutriments principaux qui sont. (**Luquet ,1986**).

-les protéines.

-les glucides.

-les lipides.

-les sels minéraux.

Ainsi que d'autres éléments qui sont :

-les vitamines (hydrosolubles-liposolubles).

-les enzymes.

3-Composition du lait de vache :

Tableau1 : la composition moyenne du lait de vache (Mathieu, 1998).

Constituants	Les teneurs du lait en ses différents constituants en g/l
Eau	902
Constituants salins minéraux	6,9
Gaz dissous	0,1
Constituants salins organiques	1,7
Lactose	49
Matière grasse	38
Protéine ou constituants azotés protéique	32
Caséines	26
Protéines dites solubles	6
Constituants azotés non protéiques	1,5
Autre constituants	1,5

4-Les propriétés physico-chimiques de lait :**4-1-Densité :**

C'est le rapport qui existe entre le poids spécifique d'un corps et le poids du même volume d'eau distillée, donc la densité du lait est la résultante des densités des ses divers constituants.

4-2-L'acidité :

L'acidité naturelle du lait de vache est liée essentiellement à la caséine et aux sels minéraux, pour être considéré comme frais, un lait doit avoir une acidité comprise entre 15°D à 18°D.

4-3-taux de matière grasse :

La matière grasse du lait est la graisse animale la plus intéressante sur le plan physiologie, car elle contient pratiquement tous les acides gras saturés et insaturés, à chaîne courtes, moyenne et longues ; soit au total plus 400 types différents.

5-Propriétés nutritionnelles des protéines du lait :

Le lait et les produits laitiers sont une source alimentaire importante pour l'enfant et l'adulte et l'on considère que les protéines de lait présentent une qualité nutritionnelle élevée. La qualité des protéines alimentaires est évaluée par rapport à leur capacité à couvrir les besoins en azote et en acides aminés pour assurer l'entretien et la croissance des tissus (**Munro, 1969**).

Cette capacité dépend à la fois de la teneur intrinsèque de l'aliment en protéine et en acides aminés indispensables mais aussi de leur digestibilité et de leur devenir métabolique. La disponibilité biologique des acides aminés représente un facteur particulièrement important de la qualité nutritionnelle des protéines alimentaires, les recommandations de la (**FAO, 1990**) prennent ainsi en compte ces différents paramètres pour l'évaluation de la qualité de l'apport en protéines dans les différents régimes alimentaires.

1-La caséine :**1-1-définition :**

Les caséines sont les protéines du lait ; elles ont un pHi de 4,6 ; et précipitent lorsque le pH du lait atteint 2,4 ; elles constituent des micelles agrégats de plusieurs molécules.

Il existe quatre groupes de caséines $\alpha s1$, $\alpha s2$, β , K (**Mathieu ,1997**).

1-2- la caséine k :

La caséine k est une phosphoglycoprotéine, elle possède un seul groupement phosphate et par conséquent une faible affinité au calcium.

le majorité de cette caséine se trouve à la surface de la micelle , ce qui la rend accessible aux enzymes , elle constitue la chevelure stabilisante dans la micelle de caséine , elle détient le rôle clé de la coagulation du lait par la présure malgré sa teneur faible par rapport aux autres caséines .sous l'action de la chymosine elle est divisée en deux parties .

-la partie N –terminal de la caséine k.

- la partie C–terminal ou caséinomacropéptide (**Ribadeau, et Dumas, 1979**).

2- la micelle :

La micelle de caséine est une particule sphérique d'un diamètre de 30nm à 300nm, formée par :

L'association des différentes des caséines et de composant salins (tableau1) dont les 2 principaux sont les calciums et le phosphate.

Selon **Schmidt (1980)**, la micelle (figure 1) serait formée de sous-unités (su micelles) d'un diamètre de 15 a 30.10^{-9} m et d'un poids moléculaire de $250000g.mol^{-1}$ la structure des sous-unités n'est pas uniforme ; elles auraient un cœur hydrophobe forme par les parties des caséines les parties polaires hydrophiles, notamment les résidus phosphosériques, seraient localisées à la périphérie. (**Mahaut, 2000**).

2-1-Tableau 2 : Composition moyenne de la micelle de caséine en g/100g (ECK A, Gillis, 1997).

Caséines	Composants salins
α_{s1} 33	Calcium 2.9
α_{s2} 11	Magnésium 0.2
B 33	Phosphate inorganique 4.3
K 11	Citrate 0.5
γ 4	
Totalcaséines 92	Total composants salins 8.0

2-2Structure de la micelle de caséine

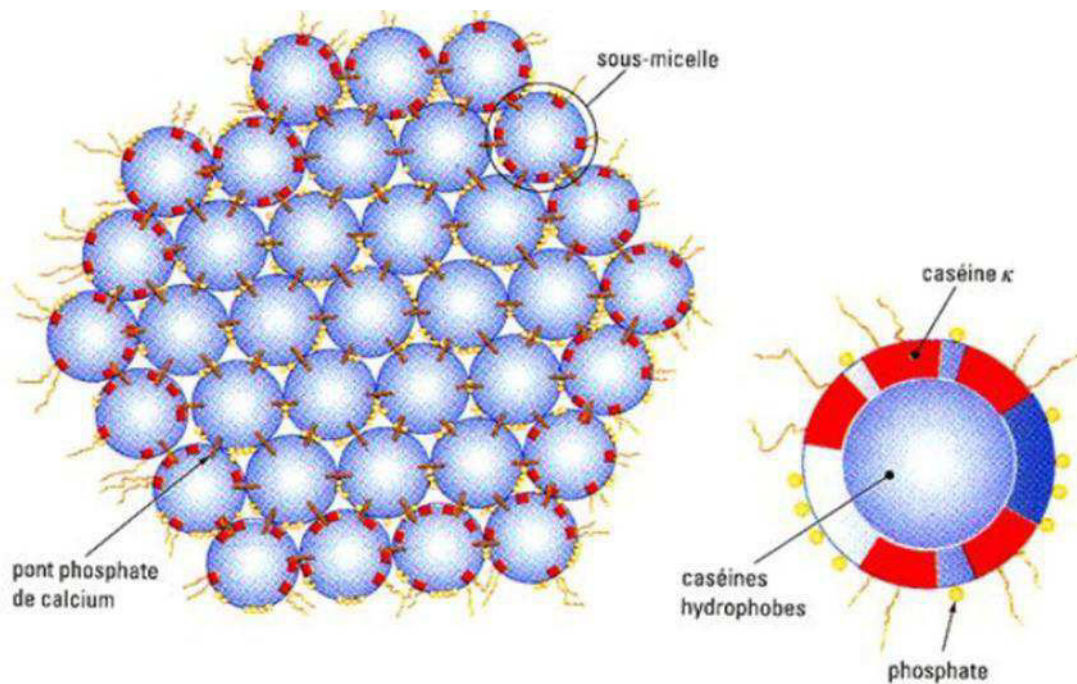


Figure 1 : Structure de la micelle de caséine (Amiot et al ; 2002).

3- la coagulation

3-1- définition :

La coagulation du lait est l'étape durant laquelle le lait passe de l'état liquide à l'état solide en formant un gel, qui résulte des modifications physicochimiques intervenant au niveau des micelles de caséine (Eck, 1990).

3-2-Mécanismes de la coagulation :

La coagulation du lait, qui se traduit par la formation d'un gel. Résulte des modifications physicochimiques intervenant au niveau des micelles de caséine. Les mécanismes proposés dans la formation du coagulum diffèrent totalement suivant que ces modifications sont induites par acidification ou action d'enzymes coagulantes.

➤ 3 2-1 coagulations par acidification :

L'acidification du lait conduit suivant les conditions, soit à un précipité de caséine, soit à la formation d'un gel. 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 granuleux dispersé dans le lactosérum. Par contre, une acidification progressive obtenue par fermentation lactique, conduit à la formation d'un gel lisse homogène qui occupe entièrement le volume initial du lait (ECK, Gillis ,1997).

➤ 3-2-2 coagulation par action de l'enzyme :

Un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou microbienne, ont la propriété de coaguler le complexe caséinique. La présure, mélange de chymosine et de pepsine, sécrétée dans la caillette des jeunes ruminants nourris au lait est l'enzyme coagulante la mieux connue ainsi que son mécanisme d'action (ECK, Gillis ,1997).

On distingue 3 phases :

- phase primaire ou enzymatique.
- phase secondaire ou d'agrégation des micelles déstabilisées.
- phase tertiaire ou phase de réticulation.

➤ **phase primaire :**

La phase primaire ou enzymatique la coagulation par hydrolyse les caséines k au niveau de la liaison phénylalanine (105) et méthionine(106) .il y a libération de caséinomacropeptide hydrophile (CMP, fragment 106-169), composé de 7 fractions qui se distinguent entre elle par leur taux de glycosylation et jouent un rôle dans la stabilité de la micelle. On le retrouve après hydrolyse dans le lactosérum et l'autre partie insoluble constitue le fromage.

➤ **phase secondaire**

Elle correspond à la coagulation proprement dite, elle commence lorsque, à pH=6,6, 80 à 90% de la caséine k est hydrolysée le CMP se détache de la caséine k est la micelle perd son caractère hydrophile ; il y a diminution de son degré d'hydratation et de son potentiel de surface. Des liaisons hydrophobes et électrostatique s'établissent alors entre les micelles modifiées et vont entraîner la formation du gel.

➤ **phase tertiaire**

Les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations par la mise en place de liaisons phosphocalcique et peut être des ponts disulfures entre les para caséines

Les mécanismes survenant au cours des phases 2 et 3 sont assez complexes et encore mal connus. un certain nombre de facteurs influent sur la coagulation tels que la concentration en enzyme , la température , le pH , la teneur en calcium , la composition en caséine , la dimension des micelles et les traitements préalables du lait tels que les refroidissement , le traitement thermique et l'homogénéisation (**Mahaut, 2000**).

➤ **3-2-3 coagulation mixte :**

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification à multitude de combinaison à des différents états d'équilibres spécifiques et à l'origine des grandes diversités des fromages à pâte molle et des fromages frais (**Cheftel, 1980**).

Dans la pratique industrielle ; un gel mixte peut être obtenu selon deux techniques :

-L'emprésurage d'un lait acide.

- Acidification d'un gel présure (**Veisseyre, 1975**).

4- Les facteurs de la coagulation par la présure :

➤ 4-1-la concentration en enzyme :

Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en enzyme, ce qui peut se formaliser selon l'équation empirique suivante :

$$T_c = K/E + t_a$$

Avec :

T_c : temps de coagulation (s).

K : inverse de la constante de vitesse.

E : concentration en enzyme.

T_a : temps écoulé entre la fin de la réaction enzymatique et le point de coagulation (s). (Mahaut, 2000).

➤ 4-2Température :

Le phénomène de coagulation est fortement dépendant de la température .Au-dessous de 10°C, la coagulation du lait ne se produit pas, Dans l'intervalle 10 à 20° C, la vitesse de coagulation est lente.

Au-dessus de 20°C, elle augmente progressivement jusqu'à 40 à 42°C ; elle diminue ensuite et Au-dessus de 65°C, il n y a plus de coagulation, l'enzyme est inactivée. (ECK, Gillis, 1997).

➤ 4-3-pH :

Le pH d' emprésurage joue un rôle important sur les caractéristiques du gel comme nous l'avons décrit précédemment et l'abaissement du pH du lait entraîne un temps de coagulation plus court. (Mahaut, 2000).

➤ 4-4-Teneur en CaCl_2 :

L'addition de CaCl_2 entraîne une augmentation du calcium ionisé et du calcium colloïdal ayant pour conséquence une augmentation de la taille des micelles (plus la dimension de la micelle est grande plus le temps de coagulation est court et un abaissement du pH par dissociation des groupements phosphoriques et carboxyliques des protéines. Le temps de prise est plus court (Lenoir, 1985 ; Mahaut et al. 2003).

1-Enzymes coagulantes :**1.1-Définition :**

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique qui interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergétiquement possibles, qu'elles accélèrent par activation spécifique dans des conditions douces de température et de pH. Ce sont des outils clés de la biotechnologie et de la bio- industrie. Un grand nombre d'enzymes protéolytiques ont la propriété de coaguler le lait (tableau N°03)(**Hamrani, 2007**).

Les enzymes coagulantes, la présure ou ses substituts, sont des endopeptidases appartenant au groupe des aspartyl protéases. Ces enzymes ont une double activité, l'une est très spécifique sur la caséine k, l'autre de protéolyse générale portant sur toutes les protéines, étant susceptibles de se manifester aux cours de l'affinage des fromages. La présure est encore à l'heure actuelle la préparation la plus largement utilisée en fromagerie (**Choisy et al, 1997**).

Tableau 3 : Origine de différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait (Hamrani, 2007).

ORIGINES		ENZYMES
Animaux	Ruminants	chymosine+pepsine
	-Veaux	chymosine+pepsine
	-Agneaux	chymosine+pepsine
	-chevreaux	chymosine+pepsine
	-Bovins adultes	
	Monogastrique	Pepsine
	-Porcs	
	Oiseaux	Pepsine
	-Poulets	
Végétaux	-Figuier (suc)	Ficine
	-Ananas (tige)	Broméline
	-Chardon, artichaut	Cyprosine
	-Gaillet	-
	-Courge	-
Moisissures	<i>-Endothiaparasitica</i>	Protéase
	<i>-Mucor pusillus</i>	Protéase
	<i>-Mucor meihei</i>	Protéase
	<i>-Aspergillus niger</i>	Protéase
		Chymosine (génétique) (utilisée à la L.F.B)
Levures	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Chymosine (génétique)
Bactéries	<i>-Echerichia coli</i>	Chymosine (génétique)
	<i>-Bacillus subtilis</i>	Subtiline(génétique)

1-2-La présure

1-2-1- Historique :

Le premier fromage a été produit par accident, lorsque les anciens stockaient dans un sac de lait fabriqué à partir de l'estomac d'une jeune chèvre, brebis ou vache. Ils ont constaté une coagulation du lait dans l'estomac.

Une fois qu'ils ont découvert le lait caillé, les morceaux solides pourraient être séparés et séchés, ils avaient découvert un moyen par lequel le lait un aliment extrêmement périssable, pourrait être conservé pour une utilisation ultérieure, l'addition de sel a été trouvée afin de préserver ces caillettes séchées, pendant de longues périodes.

A un moment donné on a découvert que la partie la plus active de l'estomac du jeune animal c'est la caillette, le dernier des quatre parties de l'estomac d'un ruminant. (Dans l'ordre, les quatre parties sont le rumen, le réseau le feuillet et la caillette (**Foucaud-Scheunemann ,2005**).

1-2-2- définition :

La dénomination "présure" est réservée à l'extrait coagulant provenant de caillettes (quatrième poche de l'estomac) de jeunes ruminants (en général des veaux) abattus avant sevrage.

Elle contient de la chymosine (80%) et de la pepsine (20%).la chymosine, l'enzyme dominante est activée en milieu acide (acide chlorhydrique de l'estomac) sa sécrétion s'arrête au moment du sevrage, alors que la pepsine s'accroît et devient dominante (**Alais 1984, Lenoir et al, 1985**).

1-2-3- la chymosine :

La chymosine est une enzyme protéolytique , elle a une double activité :une activité spécifique sur la caséine k qui conduit à la déstabilisation micellaire au cours de la phase de coagulation et une activité faible de protéolyse générale qui pourrait se manifester sur toutes les protéines pendant l'affinage du fromage (**Ramet ,1987 ;Ramet ,1997**).

La chymosine est :

- Stable à pH acide de 5,3-6,3.

- Inactive à pH = 7,5.
- Dénaturée à pH =8.
- Inactivée à une T°= 50°C.
- Dénaturée à une T°=61°C (**Guiraud, 1998**).
- et d'après ECK ; 1987 son activité maximale est à pH= 5,5 et T°= 42°C.

1-2-4- la pepsine :

La pepsine est une protéase acide présente dans le suc gastrique de tous les mammifères et les oiseaux. L'une de ses remarquables caractéristiques est sa grande activité dans cet environnement acide ; elle est active même à pH =1 ou plusieurs enzymes et protéines subissent une rapide dénaturation.

2-Propriétés physico-chimiques des succédanés de présure :

D'après **Scot, (1973) ; Reys et al, (1982)**, tout enzyme de remplacement de la présure doit présenter certaines propriétés physico-chimiques pour être utilisée à l'échelle industrielle entre –autre :

- Une bonne solubilité dans l'eau, qui va conditionner les répartitions du produit et permettre l'obtention d'une coagulation homogène.
- Une odeur et une couleur faible ou nulle, afin de ne pas modifier l'aspect et les qualités organoleptiques du fromage.
- Une bonne activité coagulante et une durée de conservation raisonnables.
- Une absence de toxicité et un degré de pureté élevé.
- une rendement fromager élevé, exprimé en poids sec de fromage, doit être plus ou moins égal à celui relevé lors de l'emploi de la présure.
- une activité enzymatique efficace et longue, capable d'hydrolyser la caséine k et provoquer la coagulation du lait.

3- succédanés de la présure :

Depuis quelque années de nombreux facteurs ont favorisé les recherches de succédanés de la présure en vue de la fabrication du fromage, citons le prix élevé des préparations commerciales de présure et certaines difficultés d'approvisionnement d'ordre zootechnique.

3-1 succédanés d'origine végétale :

De très nombreuses préparations coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures (ECK, Gillis ,1997) parmi les espèces de climat tempéré. on trouve les fleurs du chardon (cynaracardunculus) et de l'artichaut (cynarascolumus)(Tsouli,1974 ; poznanski et al,1975 ; barabosa,1976et corderio et al ,1992).

Dans les régions chaudes, on exploite également à cette fin plusieurs plantes dont on extrait des principes coagulants ; les ficines proviennent du latex du figuier. La pepsine est issue du papayer et la bromelaine et l'ananas (Eck et Gillis ,1997).

Si de nombreux extrait végétaux ont été obtenus et leurs propriétés coagulantes déterminées, il n'en demeure pas moins que leur application industrielle est actuellement très limitée.

Les inconvénients majeurs de ces extraits sont leur forte activité protéolytique qui se traduit par l'apparition des défauts de gout d'amertume observé dans les fromages préparés avec ces extraits (Alais ,1971 ; Ramet et Hardy 1973, Roseiro, 1991 et Wilkinson ,1993).

3-2-succédanés d'origine animale :

Différentes protéases digestives autres que celles contenues dans la présure ont fait l'objet d'expérimentation :

-la trypsine et la chymotrypsine, extraites du pancréas présentent une activité protéolytique élevée mais trop peu spécifique pour coaguler le lait dans des bonnes conditions. Les fromages ne sont satisfaisants au plan organoleptique.

-la pepsine bovine et la pepsine porcine provenant de l'estomac d'animaux adultes, ont fait l'objet de nombreux essais qui ont débouché sur l'utilisation industrielle. Les pepsines ont une activité protéolytique assez voisine de celle de la chymosine (ECK et Gillis , 1997).

3-3- succédanés d'origine microbienne :

L'industrie de fermentation s'est intéressée à la production de protéases susceptibles de remplacer la présure, à partir de micro-organismes .dans ce but, de multiples espèces de bactéries et de champignons inférieurs ont été étudiées afin de pallier la pénurie mondiale de présure.

En effet, il a été estimé qu'en 1974 environ 60 % de la technologie fromagère aux Etats-Unis d'Amérique utilisaient des protéases d'origine microbienne (Dalglish, 1997).

Un travail considérable a été réalisé dans la sélection de micro-organismes capables de produire des enzymes coagulants le lait .les principaux avantages des enzymes microbienne sont :

- une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques.
- une possibilité d'utilisation de matière première bon marché.
- des rendements de productions pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de fermentation.

On distingue les succédanés d'origine bactérienne et les succédanés d'origine fongique.

3-4succédanés d'origine bactérienne :

Les genres *Bacillus* et *pseudomonans* ont fourni plusieurs préparations coagulantes qui ont été testées dans des fabrications fromagères .les résultats ont été en général décevants en raison de l'activité protéolytique très élevée de ces protéases par rapport à celle de la présure (El Mayda, 1986 ; EL -Bendery et al ,2007 ; Eck et al, Jarmul et al et al ,1982).

3-5-succédanés d'origine fongique :

Ils ont été les plus largement explorés et développés car elles ont donné très tôt des résultats souvent comparables et parfois supérieurs à ceux obtenus par la présure (**Ramet, 1997**). En effet, parmi ceux-ci on trouve :

-*Mucor pusillus* qui a permis d'obtenir des fromages de tous les types et de bonne qualité (**pien, 1974**).

-*Endothia parasitica* est produite industriellement aux USA. Les essais réalisés par (**Veisseyre, 1979**) montrent que cette enzyme s'apparente à la présure.

-*Mucor miehei* qui a donné des résultats montrant une parenté intéressante avec la présure (**Veisseyre, 1979**). Ainsi cette enzyme a permis d'obtenir un camembert d'excellente qualité un peu plus doux et onctueux que les fromages témoins préparés avec la présure d'origine animale (**luquet, 1990**).

1-Origine de la citrouille (*cucurbita pepo l.*) :

La citrouille est cultivée depuis des millénaires dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique après que les espagnoles ont découvert l'Amérique, la citrouille a été importée en Europe et en Asie, où elle était accueillie comme légume bon marché et alimentaire.

C'est un légume saisonnier et pousse partout dans le monde, il figure parmi les légumes les plus anciennement cultivés de nos jours, la citrouille se classe au troisième rang de produits maraichers consommés en période estivale après la tomate et le poivron (Snoussi ,1981).

2-Description botanique :

La citrouille appartient à la famille des cucurbitacées, c'est une plante annuelle, monoïque et herbacée, à tige souple, courte et plus au moins dressée ou longue et rampante sur le sol ou s'accroche à des supports variés par des vrilles.

Le système racinaire est fort développé, la tige porte des feuilles lobées très rapprochées, Couvertes de poils très durs, aux aisselles des quelles prennent naissance les fleurs et les fruits.

Les fleurs sont larges, jaunes généralement à sexes séparés, la pollinisation est assurée par les insectes surtout les abeilles (Snoussi, 1983).

3-classification :

La citrouille (*cucurbita pepo l.*) peut être classée comme suit (anonyme ,1983).

Embranchement : plante.

Subdivision : trachéophyte (plante vasculaire).

Super division : spermatophyte (plante à graine).

Division : magnoliophyte (plante à fleurs).

Classe : magnoliopsida.

Sub classe : dilleniidae.

Ordre : violales.

Famille : cucurbitacées.

Genre : *cucurbita*.

Espèce : *cucurbita pepo l.*

4-constituants principaux des graines de citrouille :

Les graines de citrouille renferment une importante quantité de protéine (25%) et de matière grasse (48%) dont le profil d'acide gras est dominé par les acides gras insaturés (acide linoléique et oléique). Comme elles renferment des constituants sous forme de traces telles :

Tocophérol (0,1 %) et les phytostérols (0,1 à 0,5%). **(Chevalier ,1997).**

Tableaux 4 : composition moyenne des graines de citrouilles égrainées, non grillées et non salées pour 100 g (**chevalier, 1997**).

Elément	Teneur	Elément	Teneur
Energie	153 kcals	Acide gras .poly insaturés	5,9g
Protéines	7g	Oméga-6	5,8g
Glucides	5g	Oméga-3	0,05g
Fibres	1,1g	Fer	4,2mg
Lipides totaux	13g	Zinc	2.1mg
Acide gras. saturés	2,4g	Vitamine A	107,7 UI
Acide gras mono insaturés	4g	Vitamine B	0,28 mg

5-propriétés des graines de citrouille :

Depuis longtemps les graines de citrouille sont utilisées par l'homme comme remède à diverses maladies leurs propriétés thérapeutiques sont identifiées et reconnus depuis fort longtemps. Les graines de citrouilles ont des propriétés diurétiques, ils soulagent les troubles de la miction associés à l'hyperplasie bénigne de la prostate.

- Ils sont vermifuges, le cucurbitin qu'elle renferme paralyse les vers (le ténia).
- En Amérique centrale, on s'en servait pour traiter les néphrites et les affections du système urinaire.
- Réduit en poudre et administrées sous forme de pate, les graines de citrouille sont aussi utilisées pour traiter la fièvre et les désordres gastro-intestinaux. (**Nadhour, Belloul, 2003**).

Les moisissures :**1-Définition :**

Les moisissures sont multicellulaires mais la notion de cellule est assez floue car leur structure est mycélienne et coenocytique, la paroi est riche en cellulose ou en chitine, le corps ou thalle d'une moisissure est fait de 2 parties –le mycélium et les spores, le mycélium est un ensemble de plusieurs filaments appelés hyphes.

Chaque hyphe mesure 5 à 10 μ de diamètre et possède un cytoplasme commun.

2-Structure :

Les cellules fongiques sont rassemblées en filaments plus ou moins ramifiés hyphes. Leur enchevêtrement constitue le thalle qui se présente sous la forme d'un feutrage plus ou moins dense, le thalle constitue l'appareil végétatif et la base de l'organisation cellulaire des champignons il présente le plus souvent une forme filamenteuse. Les thalles filamenteux sont cloisonnés ou siphonnés. Un thalle siphonné est sous un état coenocytique (**Boiron, 1996 ; Larpent, 1997 ; vierling, 2004**).

3-Conditions de développement :

Tous les champignons sont chimio hétérotrophes. Leur source de carbone et d'énergie proviennent des molécules carbonées organiques (**Larpent, 1997**).

A la surface d'un substrat, les spores germent pour produire des hyphes. Les filaments mycéliens s'allongent par leur apex (extrémité), se ramifient plus ou moins pour occuper la surface du support en donnant des colonies circulaires. Ils pénètrent à l'intérieur du substrat en le digérant par des exo enzymes. Lorsque les nutriments se raréfient, les mycéliums produisent des spores en grand nombre (**Vierling, 2004**).

3.1- Besoins nutritifs :

Les sources de carbone les plus fréquemment et les plus facilement utilisées par les moisissures sont les glucides. Ces organismes peuvent souvent utiliser des polymères complexes.

Les moisissures sont, selon les espèces, des organismes autotrophes ou hétérotrophes pour l'azote. La plupart utilisent, comme source d'azote, les nitrates ou les sels ammoniacaux mais aussi les acides aminés quoique, en général on obtient une croissance

plus rapide en s'adressant à des sources riches en azote organique (**Meunier et Simon, 1970 ; Leyral et Vierling, 2001**).

Du fait de leur hétérotrophie, certains champignons se développent en décomposant des organismes morts ou leurs résidus, ce sont les saprophytes (**Durrieu, 1993**).

3.2-Oxygène :

Quelque espèce de champignons est micro aérophiles. La majorité des espèces sont aérobies. Quelques espèces sont anaérobies strictes (**Larpent, 1997**).

3.3- Température :

Les moisissures sont mésophiles, avec des températures optimales de croissance comprises entre 20°C et 30°C, d'autres sont psychrophiles avec une température de croissance <15°C et certaines espèces sont très résistantes à la chaleur et sont capables de continuer à croître à des températures supérieures à 50°C (**Leyral et Vierling, 2001 ; Nicklinet al. 2000**).

3.4- Potentiel hydrogène (pH) :

La grande majorité des champignons peut se développer dans une zone de pH comprise entre 4,5 et 8,0. Les optima se situent entre 5,5 et 7,5 (**Larpent, 1997**).

4-Reproduction :

Les mycètes se reproduisent à partir de spores qui se forment à l'extrémité d'hyphes spécialisés. Arrivés à maturité, les spores se détachent et sont disséminées par le vent, l'eau ou les insectes. Dans des conditions favorables, elles germent, émettent des hyphes simples ou ramifiées qui se développent considérablement pour constituer finalement un mycélium. Il existe une très grande diversité dans la manière dont se forment les spores. (**Leclerc et al., 1995**).

4.1-Reproduction asexuée :

Elle est assurée par la production de spores qui se différencient à partir des cellules fongiques. Trois mécanismes principaux peuvent être rencontrés :

- Des spores produites par transformation des cellules du thalle, thallospores ou arthrospores. Le mycélium arrête sa croissance, les cellules terminales se différencient, se divisent et se séparent.

- Des cellules fongiques se multiplient et se différencient pour former une cellule particulière, le conidiophore, sur le quelle se forment les spores qui sont les conidies
- Des cellules fongiques se multiplient et se différencient pour donner des sporanges dans lesquels se forment des sporangiospores. Ces dernières sont libérées par l'ouverture du sporange parvenu à maturité.

4.2-Reproduction sexuée :

A partir d'hyphes déjà différenciés, se forment des cellules jouant le rôle de gamètes. Leur fusion équivaut à une fécondation. La cellule qui en résulte subit des transformations plus ou moins importantes pour donner une spore. On connaît quatre sortes de spores issues de la reproduction sexuée (**Leyral et Vierling, 2001**) :

- Les zygosporés : deux hyphes voisins produisent des branches latérales ou progamétanges à l'extrémité desquelles se différencient deux gamétanges identiques ; ceux-ci fusionnent pour donner une cellule dont la maturation aboutit à une zygosporé.
- Les oosporés : le mécanisme de leur production est très proche de celui du zygosporé mais la différence vient du fait que les gamétanges qui fusionnent sont de morphologie différente.
- Les ascosporés : elles ont une origine endogène, elles se forment dans une cellule particulière appelée asque. Les asques sont eux-mêmes issus d'hyphes et se forment dans un appareil particulier discoïde (apothécie) ou sphéroïde (périthèce).
- Les basidiosporés : comme les ascosporés elles résultent d'une méiose mais elles sont exogènes et sont portées par une cellule spéciale, la baside.

5- Importance économique des moisissures :

L'intérêt économique des champignons repose sur leur capacité à produire une grande diversité de molécules. Le monde des champignons représente un ensemble très hétérogène dont les individus occupent toutes sortes d'habitats. Cette caractéristique a pour conséquence une grande diversité métabolique et biochimique. En effet, de nombreux champignons ne répondent pas aux critères qu'impose une exploitation industrielle : culture facile sur un milieu défini, peu cher, répondant aux manipulations génétiques empiriques (**Boiron, 1996**).

6-Production d'enzymes par les moisissures :

L'industrie des enzymes d'origine fongique a fait des progrès importants au cours de ces récentes années (**Bourgeois *et al.*, 1996**).

Le chiffre d'affaire total du marché des enzymes, y compris celle utilisées par des diagnostics médicaux, est de l'ordre du milliard de dollars dont 40% sont représentés par les enzymes fongique. Chez les champignons la synthèse d'enzymes exo cellulaires est prépondérante et la récupération de ces molécules est plus aisée et moins couteuse. La culture des champignons pour la production d'enzymes se fait soit sur substrat solide soit en culture submergée comme pour la production de la plupart des métabolites d'origine microbienne (**Botton *et al.*, 1990**).

Les souches fongiques généralement acceptées pour produire des enzymes alimentaires comprennent actuellement les genres suivants : *Aspergillus*, *Endothia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* (**Durand et Monsan, 1982**).

7-Rôles des enzymes en agro-alimentaire :

Dans les industries agro-alimentaires, les enzymes peuvent jouer plusieurs rôles :

- Amélioration de la composition des matières premières et/ou leur procédé de transformation.
- Obtention des produits nouveaux ou de meilleure qualité.

Les matières premières dans l'industrie agro- alimentaire sont des produits complexes, elles peuvent être d'origine animale ou végétale qui fait intervenir plusieurs étapes pour leur biosynthèse.

Il existe des facteurs internes (les régulations liées à l'espèce) et des facteurs externes (les conditions climatiques de croissance) qui peuvent modifier la composition globale de la matière première et de leur transformation. Les enzymes exogènes peuvent alors être employées en tant qu'additifs pour pallier les manques naturels, par exemple les lipases et les protéases exogènes remplacent les enzymes naturelles du lait détruit par la pasteurisation. En fromagerie, l'utilisation des protéases pour la coagulation du lait est la première étape de la fabrication. Des cocktails de protéases et de lipases permettent d'accélérer le processus de maturation des fromages. Pour cette application l'évolution des enzymes tiendra surtout à la présence d'activité secondaire utile et à l'obtention d'enzymes recombinantes. La chymosine, protéase recombinante produite chez *kluyveromyceslactis*,

Escherichia-Coli ou *Aspergillus Niger*, est autorisée en remplacement de la présure de veau dans certains pays.

Les enzymes permettent également l'apparition de saveurs nouvelles. Les lipases ajoutées aux caillés de lait de vache participent pour beaucoup à l'aromatisation des fromages (obtention d'arômes typiques de *Romano*, *Manchego*, *Feta*, habituellement propres aux laits de chèvres et brebis – augmentation de l'arôme de *Mozzarella* ou *Parmesandu* à la libération d'acide gras à chaînes courtes) (Lorreta-G, 1997).

8- Caractères physiologiques :

Ce sont des eucaryotes, non photosynthétiques, hétérotrophes et immobiles. Elles sont acidophiles et sont obtenues sur milieu à pH acide (compris entre 3 et 7), elles sont mésophiles, température optimum 20°C à 30°C, d'autres sont psychotropes température < 15°C.

Elles sont à l'origine d'altérations superficielles et certain souches produisent des toxines.

9-Application en industrie alimentaire :

Beaucoup sont utilisées dans la fabrication des fromages, saucissons secs, enzymes, antibiotiques.

Aspergillus : produit une enzyme voisine de la présure.

Penicillium : est à l'origine de la fleur du camembert.

Penicillium roquefort : est actif au niveau du roquefort et des fromages bleus.

Sont des éléments capitaux de la microflore des fromages à pâte pressée ou molle dite à croûte fleurie, *Geotrichum candidum* redouté pour les pâtes molles est au contraire recherché pour celles qui sont pressées.

Penicillium camembertii : est la moisissure blanche recouvrant de nombreux fromages à pâte molle (type camembert), c'est une espèce peu protéolytique.

P.camembertii peut à partir des acide gras, produire par β oxydation, des composés aromatiques du type méthyle cétone ; aldéhydes et alcools secondaires. (Ait Abdelouahab, 2001).

Le genre Mucor et son utilisation industrielle :

1-Généralités :

La plupart des Mucor vivent sur des matières végétales ou animales en décomposition mais aussi dans le sol. Leurs spores asexuées, habituellement dispersées par le vent, se développent dans les sporanges à l'extrémité des hyphes aériens. La reproduction sexuée produit des zygotes durs, entourés par une paroi épaisse et appelés zygosporés ; ils restent dormants quand l'environnement est trop rude pour la croissance du mycète. Seul l'ordre Mucorales a un intérêt alimentaire (**Leclerc *et al*, 2000**).

2-les moisissures les plus utilisées pour les enzymes coagulantes :

a-*Mucor pusillus* :

Moisissure banale du sol exploitée par la firme japonaise METTOSANGYO, la préparation enzymatique est commercialisée par Noury sous la dénomination de Noury-renn, l'extrait est utilisé surtout aux Etats-Unis pour la fabrication du cheddar depuis de nombreuses années. Ce fromage est semblable à celui obtenu par la présure (**Stefanova *et al*, 1984**).

En ce qui concerne le fromage de type EDAM, la saveur est moins fréquemment défectueuse que l'EDAM fabriqué par la présure (**Eck, 1987**).

D'après **Pien (1974)**, la présure permet d'obtenir des fromages de tous les types de bonne qualité. Cependant, il a été constaté qu'une des causes possibles d'une faible perte de rendement peut être la fragilité un peu plus grande des caillés obtenus avec cette enzyme. Il faut éviter une agitation trop grande au moment du décaillage pour que les poussières de caillé ne partent pas dans le sérum. Toujours d'après le même auteur, on peut obtenir des fromages un peu secs avec cette enzyme.

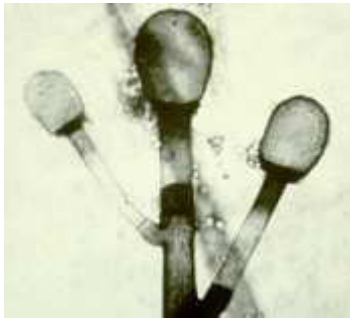


Figure 2 : Un thalle de *Mucor pusillus* avec des spores.

b-*Mucor miehei* :

Moisissure banale du sol, les préparations sont produites par :

- Une firme française RAPIDASE sous la dénomination fromase.
- Danoise nano industrie sous le nom de rennilase.
- Américaine mille sous l'appellation marzyme.
- Danoise Ball Hansen sous le nom hammilase.

c-*Endothiaparasitica* :

C'est une moisissure parasite du châtaignier.

La préparation enzymatique est produite par la firme américaine PFIEZER et commercialisée sous le nom sufaren.

La fermentation :**1 – Définition :**

Les fermentations sont des voies cataboliques anaérobiques au cours desquelles des composés organiques servent à la fois de donneurs et d'accepteurs d'électrons la synthèse d'ATP étant réalisée par phosphorylation au niveau du substrat .En microbiologie industrielle, le temps de fermentation désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de microorganismes. **(Pascal et al ,2004).**

2- Buts de la fermentation :

La mise en œuvre des procédés de la fermentation industrielle peut tendre vers divers buts qui sont :

- l'obtention des micro-organismes eux-mêmes ; en quantité importante pour la préparation des protéines, ou des autres constituants cellulaires ;
- la production de composés ou produits sécrétés naturellement par les micro-organismes comme les enzymes, les pigments ou les toxines ;
- la production des métabolites, des certaines conditions, comme les antibiotiques, les vitamines ou les aminoacides par les micro-organismes ;**(Simon et Meunier, 1970)**

3- Types de fermentation**3-1 fermentation sur milieu liquide :**

Cette technique a été la première utilisée .Elle consiste à cultiver les moisissures sur la surface d'un milieu nutritif liquide , elle nécessite des conditions aseptiques strictes .La culture d'un milieu liquide s'effectue dans des récipients agités ,et le plus souvent dans des Erlenmeyers , placés sur des appareils d'agitation qui favorisent la diffusion de l'air à travers les tampons de coton servant à les boucher (**Simon et Meunier,1970**).

3-2 fermentations sur milieu solide ou semi-solide :

La culture des micro-organismes s'effectue sur des milieux solide ou semi-solides, à base d'agar ou constitués de matériaux inertes comme le son, imbibé de milieu nutritif. L'aération est assurée par la diffusion de l'air à travers les tampons de coton des Erlenmeyers, il faudrait aussi que le milieu solide ne soit pas pâteux mais suffisamment poreux. Le développement du mycélium dépendra de l'homogénéité et de la répartition de l'inoculum et des sels minéraux ajoutés dans la masse des substrats solides (**Simon et Meunier, 1970**).

4- les diverses étapes suivies en fermentation solide :

Les différentes étapes suivies au cours d'une fermentation solide sont :

La préparation du substrat ou du milieu de culture, la stérilisation du milieu (généralement à 121°C pendant 21 minutes) suivie par le refroidissement de celui-ci l'inoculation du milieu de culture, l'incubation du milieu inoculé en maintenant dans la mesure du possible les conditions environnementales optimales (température, pH, teneur en eau) (**Assamoi et al, 2008**).

- ❖ **Isolement** : A partir des fermentations naturelles de l'eau, de l'air, du sol, ou les matériaux organiques ou même inorganiques, les obtenir déjà isolés à l'état de culture en s'adressant aux collecteurs des souches. (**Simon et Meunier, 1970**)
- ❖ **La préparation du substrat carboné** : les substrats carbonés utilisés en fermentation solide proviennent essentiellement des résidus agricoles et agroalimentaires. (**Assamoi et al, 2008**).
- ❖ **Fermentation proprement dite** : après avoir amélioré la souche dans des boîtes de pétrie sur le milieu solide qui sont des milieux sélectifs favorisent le développement rapide de la souche. (**Simon et Meunier, 1970**).
- ❖ **L'inoculation du milieu de culture** : l'inoculation du milieu de culture se fait le plus souvent à partir d'une suspension de spores (**Mathot, 1996**).
- ❖ **Optimisation de la température, de la teneur en eau, du pH et de l'aération de la culture** : à l'échelle industrielle, les contrôles de la température de culture et de l'humidité du milieu sont très importants. (**Bellon et al, 2003**).

5 –Extraction et purification des enzymes :

Après la fermentation terminée, les enzymes doivent être séparées des cellules et du milieu, et traitées de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités. Ces traitements sont des opérations unitaires simples telles que centrifugation, filtration, évaporation, précipitation, séchage. **(Scriban ,1988).**

Le fromage :**1- Définition :**

Le fromage est un produit fermenté ou non ; obtenu par coagulation du lait ; de la crème ou de leur mélange ; suivi d'égouttage, il doit contenir au moins 23 g de matières sèches pour 100 g ; il s'agit habituellement d'un concentré des protéines. Caséines du lait obtenu par caillage et dont l'égouttage en moule de forme définie conduit à un produit fini gardant cette forme. (**Joseph, 1998**).

2- Variétés des fromages : Ils sont représentés dans le tableau 5.

Tableau5 : Classification des fromages en fonction des opérations de fabrication (Garde, 1997).

Pâte			Opérations	Exemples
Fromage frais ou à pâte fraîche			Ce sont des fromages à égouttage obtenus par centrifugation ou filtration. Ils subissent essentiellement une fermentation lactique.	- Petite suisse - Fromage demi-sel.
Fromage à pâte molle		A croûte lavée	Ce sont des fromages obtenus par action de la présure qui subissent un affinage après la fermentation lactiques. Mais dans la pâte ni cuite, ni pressée. L'égouttage est lent ; réalisé par simple découpe et éventuellement un brassage	- Munster - Livarot - Pont l'évêque
		A croûte moisie		- Camembert - Brie - Carre de l'est
		Persillé (à moisissures internes)		Roquefort et autres « Bleu »
Fromage à pâte pressée	Non cuite	Pate fermée non cuite	Ce sont des fromages obtenus par action de la présure ; qui subissent un affinage après la fermentation lactique ; sont obtenus par un égouttage avec découpage du caillé ; brassage et pression.	Cantal
		A croûte lavée		Saint –Paulin Reblochon
		A croûte moisie		Saint –Paulin ; Tomme de Savoie
		A croûte artificielle		EDAM
				Emmenthal Comté
	Cuite	Avec ouverture		Beaufort
		Sans ouverture		Cheddar
		Très dure (très brassée)		
	Fromages fondus			

3- valeur nutritionnelle des fromages :

L'intérêt alimentaire des fromages présente de nombreux points communs avec celui du lait. Toutefois leur fabrication s'accompagne de modification de composition et de valeur nutritionnelle (**Emilie F, L, 2005**).

En plus d'être une source de divers éléments nutritifs comme des vitamines et des protéines d'excellente qualité, les fromages, surtout ceux à pâte ferme et dure, contiennent une grande quantité de calcium (**Amiot et al ,2002**)

4-Composition du fromage :

4-1 protéines : selon leur mode de fabrication, les fromages contiennent de 10 à 30 % de protéines.

Ce sont l'aliment les plus riches en protéines, en particulier les fromages à pâte pressée dont la teneur en protéines (30%) dépasse celle de la viande (20%).ces protéines proviennent de la caséine modifiée dont , au cours de l'affinage , une partie importante (entre 20 et 30% selon les fromages) se trouve dégradée et solubilisée en oligopeptides et acide aminés sous l'influence d'une série d'enzyme , différentes selon la micro flore , ce qui confère au produit final sa texture et sa saveur .du fait de cette protéolyse les protéines du fromage sont aisément digestibles . outre sa teneur élevée en protéines , la haut valeur biologique du fromage lui est conférée par sa composition en acides aminés très intéressante sur le plan notionnel (**ECK et Gillis , 1997**).

4-2--lipides : les lipides conditionnent l'onctuosité de la pâte du fromage, au cours de la maturation se produit, sous l'influence de lipases microbiennes , une lipolyse limitée avec formation d'acides gras libres qui va de 0.25% de la matière grasse dans le camembert frais a 6.4% dans les camembert très affiné . Certains de ces acides gras sont volatils et interviennent dans la formation de l'arôme. Les lipides du lait (triglycérides, phosphoglycérides, sphingosides) se trouvent dans le fromage sous forme émulsionnée, ce qui les rend plus digestibles. (**ECK, Gillis1997**).

4-3-les glucides : les fromages affinés ne contiennent en général pas de glucides ; la petite quantité de lactose restant dans le caillé en fin d'égouttage est transformée en acide lactique au cours de l'affinage. Cependant, dans les fromages frais, égouttés et peut fermentés, on trouve des quantités appréciables de lactose, d'acide lactique et citrique. Il

en de même dans les fromages fondus additionnés de lactose et d'acide citrique au cours de la fabrication, (Amiot et al, 2002).

4-4 les sels minéraux :

-calcium : les fromages constituent d'excellentes sources de calcium .toutefois, les taux de calcium varient en fonction de la teneur en eau et du mode de fabrication (ECK, Gillis 1997).

-sodium : le sodium est apporté au fromage sous forme de chlorure de sodium ; ce dernier intervient au cours du salage ; il permet de

- compléter l'égouttage
- limiter la prolifération de certaines moisissures
- relever la saveur du fromage (Glaude, D ,2001).

4-5-les vitamines :

-les vitamines liposolubles : la teneur en vitamines A ; D et E dépend de leur taux en matière grasse ; la saison à laquelle le lait a été produit joue également un rôle les fromages fabriqués avec le lait de printemps ou d'été ont une activité vitaminique supérieure à celle des fromages issus de lait d'hiver (Mahaut, 2000).

- les vitamines hydrosolubles : la teneur en vitamines liposolubles varie considérablement selon les fromages ; elle est le résultat de deux facteurs opposés ; la perte qui survient au moment de l'égouttage et l'enrichissement qui survient au cours de l'affinage (vit C et B) (Glaude, D ,2001)

1-Technologie de la fabrication d'un fromage :

La transformation du lait en fromage comporte en général quatre étapes principales qui sont : la coagulation, l'égouttage, le salage, et l'affinage (**brule, al, 1997**).

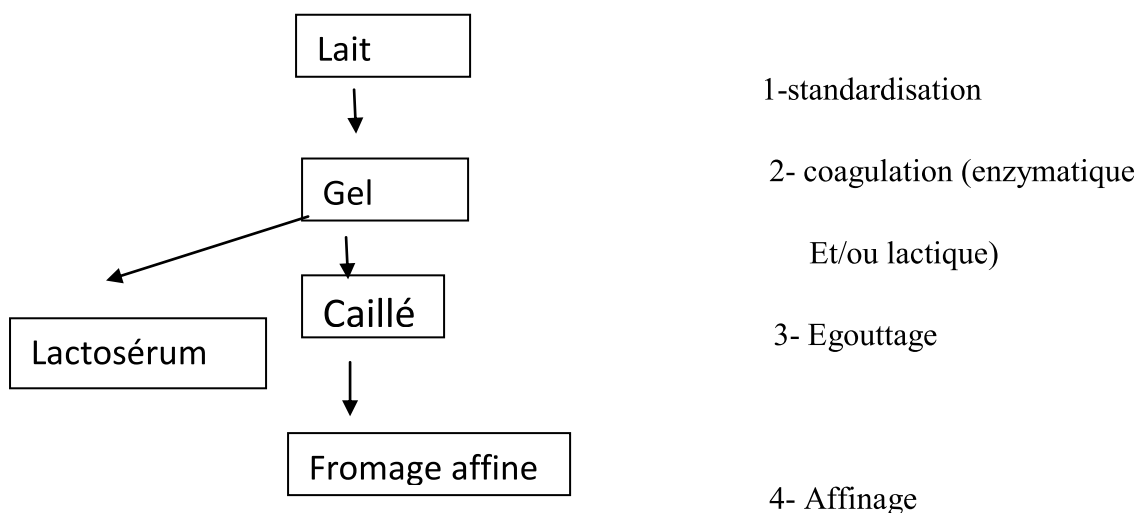


Figure 3 : Technologie de la fabrication d'un fromage (**Mahaut, 2000**).

2-standardisation du lait :

La qualité du lait de fromagerie peut être définie comme l'aptitude à donner un bon fromage dans des conditions normales de travail avec un rendement satisfaisant.

Outre sa complexité et son hétérogénéité, le lait présente une grande variabilité dans sa composition selon l'espèce animale, la race, l'individu, le stade et le numéro de lactation, le mode et le montant de la traite, la saison, le climat, l'alimentation etc....

Tous les laits n'ont pas la même aptitude à la transformation fromagère, car ils présentent des caractéristiques différentes et une histoire qui leur sont propres, telles la richesse et la composition en caséines, les équilibres salins, la teneur en lactose, la qualité etc. (**Mahaut, 2000**).

3- La coagulation :

Modification physico-chimique des micelles de caséine sous l'action d'enzymes protéolytique et /ou d'acide lactique ; elles entraînent la formation d'un réseau protéique appelé « coagulum » ou « gel » (**Gaursaud, 1993**).

4- l'égouttage :

Cette phase consiste en l'élimination plus ou moins grande du lactosérum emprisonné dans les mailles du gel formé par voie acide et /ou enzymatique. Cette élimination du lactosérum sera plus ou moins rapide selon la nature du coagulum.

L'égouttage commence dans les cuves de coagulation, se poursuit dans les moules puis dans les hâloirs (**Mahaut ,2000**).

5- le salage :

Le salage est l'incorporation de sel par dépôt en surface ou dans la masse, ou immersion en saumure (**Eck, 1990**).

6- l'affinage :

Transformation biochimique des constituants du caillé sous l'action d'enzymes, pour la plupart d'origine microbienne (**Eck, 1990**).

Dans la plupart des fabrications, entre la 2^{ème} et la 3^{ème} étape, se situe l'opération de salage qui représente à la fois un complément d'égouttage et un facteur important de la maîtrise de l'affinage par réglage de l'activité de l'eau .(**Mahaut, 2000**) .

7 –Fromage à pâte pressée non cuite type EDAM :**7-1 -Historique :**

C'est à la fin du XIX^{ème} siècle que se développe la production industrielle du fromage en Europe occidentale et en Amérique du nord.

En 1900, des industriels allemands et hollandais enferment le fromage à pâte molle et le fromage à pâte demi dure dans des boites soumises à un traitement de pasteurisation afin de résoudre le problème de conservation (**Eck, Gilles 1997**).

Le fromage EDAM a été fabriqué pour la première fois au XVII^{ème} siècle dans la localité d'EDAM, ville située près de « Zuiderzee» au nord de la Hollande.

7-2- Définition :

C'est un fromage obtenu à partir d'un lait coagulé en cuve, où sont effectués un découpage et un brassage accélérant l'égouttage suivi d'un saumurage, et qui subit un affinage d'une durée de 3 à 4 semaines en caves d'affinage.

7-3-les caractères physico-chimiques de l'EDAM :

Les caractères physico-chimiques de l'EDAM sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Les caractères physico-chimiques de l'EDAM (Luquet, 1985).

caractères physico-chimiques	Normes
Extrait sec total (EST)	51% ±1%
Gras /sec	< 45% ± 1%
NaCl	1.5 à 2 %
pH	5.3 ± 5.5
Humidité	50 ± 2%

7-4- Caractères microbiologiques :

- Absence totale des germes pathogènes (salmonelle staphylocoques aureus).
- Absence de la flore fongique.

7-5-Le processus de la fabrication de fromage type « EDAM » à l'unité de LFB avec la présure (voir figure 4) :

7-5-1-collecte de lait : se fait à partir des citernes de lait cru réceptionnées conformément à l'exigence de laboratoire de l'unité (pH : entre 6,55 et 6,65, EST : 78% et 86%, densité : entre 1028 et 1030, MG : entre 30 et 44 g/l, acidité : entre 16 et 17 °D).

7-5-2-pasteurisation : c'est un chauffage selon le barème qui respecte la combinaison (entre 82°C et 85 °C pendant 15 secondes), il est modéré et contrôlé pour éviter l'incorporation élevée des protéines sériques et pour réduire le maximum de la charge microbienne.

7-5-3- Refroidissement : Immédiatement après le chauffage, le lait réfrigéré à l'abri de l'air, dans des échangeurs à plaques entre 6°C et 8°C ou l'eau chaude est remplacée par de l'eau froide. Cette opération est capitale dans le maintien de la qualité du lait.

7-5-4- Stockage : le lait est stocké dans des tanks à 8°C, pendant 16h afin d'améliorer sa qualité pour l'emprésurage et pour rétablir certains équilibres physico-chimiques par les traitements thermiques.

7-5-5 – l'ensemencement : A ce moment, le lait doit avoir une acidité de 20°D et une température de travail en cuve de 30°C. L'addition de levains (80% des ferments mésophiles et 20% des ferments thermophiles) pendant le remplissage de la cuve. On ajoute en même temps (au moment de remplissage de la cuve) de phosphate monocalcique et de rocou.

7-5-6- l'emprésurage : On utilise pour l'emprésurage de la présure lyophilisée, et se fait en général 20 à 30 minutes après l'ensemencement, la dose de la présure est diluée dans de l'eau tiède. La présure doit être répartie aussi régulièrement que possible en laissant marcher les brassoires pendant une minute ensuite les mouvements du lait doivent être arrêtés immédiatement afin d'éviter l'obtention d'un caillé feuilleté, se traduisant plus tard, lors du démaillage, par une irrégularité de grains.

7-5-7 – la coagulation : le temps de coagulation est lié directement à la dose de présure appliquée et le temps de prise (temps correspondant à l'apparition de petits grumeaux) est entre 5 et 10 minutes ; donc, la coagulation est de trois fois le temps de prise, c'est-à-dire 30 minutes.

7-5-8 -Le décaillage : le décaillage se fait par les tranche-caillé à une vitesse la plus faible possible, pour limiter les pertes car le caillé est encore fragile. Cette opération dure 15 à 20 minutes et elle se fait en deux temps séparés par 5 minutes de repos, on recherche des particules de taille d'un grain de maïs les principaux objectifs de décaillage sont :

- Favoriser l'évacuation du sérum.
- Augmenter le taux de l'extrait sec.

7-5- 9-Brassage – délactosage : le premier brassage est de 15 à 20 minutes selon la qualité de lait, il consiste à accentuer l'assèchement des grains de caillé, et au cours duquel se produit l'évacuation du sérum qui surnage dans la cuve, ce dernier représente 40 à 50% du volume total du lait utilisé et a une acidité de 16 à 20 D°. On procédera par la suite au délactosage qui est un lavage par l'eau chaude (40°C) et qui représente le même volume de lactosérum jeté. Le deuxième brassage est effectué après lavage du caillé, dans ce cas, le

sérum évacué doit être clair avec une acidité proche 9 D°, ce brassage est de 20 à 30 minutes, la température du mélange caillé-sérum qui est de 30-38 C°, intervient comme facteur d'égouttage.

7-5-10- Pré pressage – moulage : le caillé ou subsiste encore une petite quantité de sérum, est évacué vers le bac de pré pressage, et au fur et à mesure de son remplissage, le caillé est égalisé à l'aide de rames en vue d'obtenir un gâteau homogène, on procédera ensuite au pressage du gâteau par plaques en métal très lourdes et percées de trous, en fin d'égouttage, le caillé a un PH inférieur à 5,6 au bout de 20-30 minutes, on enlève ces plaques et on découpe le gâteau obtenu en pain à l'aide des couteaux placés à l'extrémité du bac. Les pains sont ensuite retirés et placés dans des moules contenant des toiles.

7-5-11-Pressage : les fromages mis en moules sont placés sous presse durant 6 heures au minimum, la pression exercée est de l'ordre des bars et le premier retournement s'effectue après 30 minutes. Le pressage permet d'augmenter l'extrait sec et d'acidifier le fromage, en effet une fabrication d'EDAM est considérée comme réussie, si le sérum évacué par le pressage est limpide et pH du fromage est situé entre 5,4 et 5,5.

7-5-12-Démoulage-salage : Après démoulage le fromage subit un salage par immersion de ce dernier dans un bain de saumure saturée pendant 16 heures. Selon (ANONYME, 1995), le salage a un triple rôle :

Il complète l'égouttage et contribue à la formation de la croûte.

Il règle l'activité de l'eau (a_w) du fromage et par là, freine ou oriente le développement des micro-organismes et les activités enzymatiques en cours de l'affinage.

Il relève la saveur du fromage et masque le goût de certaines substances formées au cours de l'affinage.

7-5-13-Affinage : l'affinage est réalisé dans des hâloirs à température de 10 à 12 °C, avec 85-95% d'humidité relative. Au niveau de l'unité, l'EDAM subit un affinage de 21 jours au minimum.

7-5-14 -Conditionnement: les fromages sont d'abord grattés pour enlever la croûte dure et enrobés de paraffine fondue portée à 110-115°C, puis emballés sous vide dans cellophane avec l'étiquetage et conservés à 6°C, en attendant leur commercialisation.

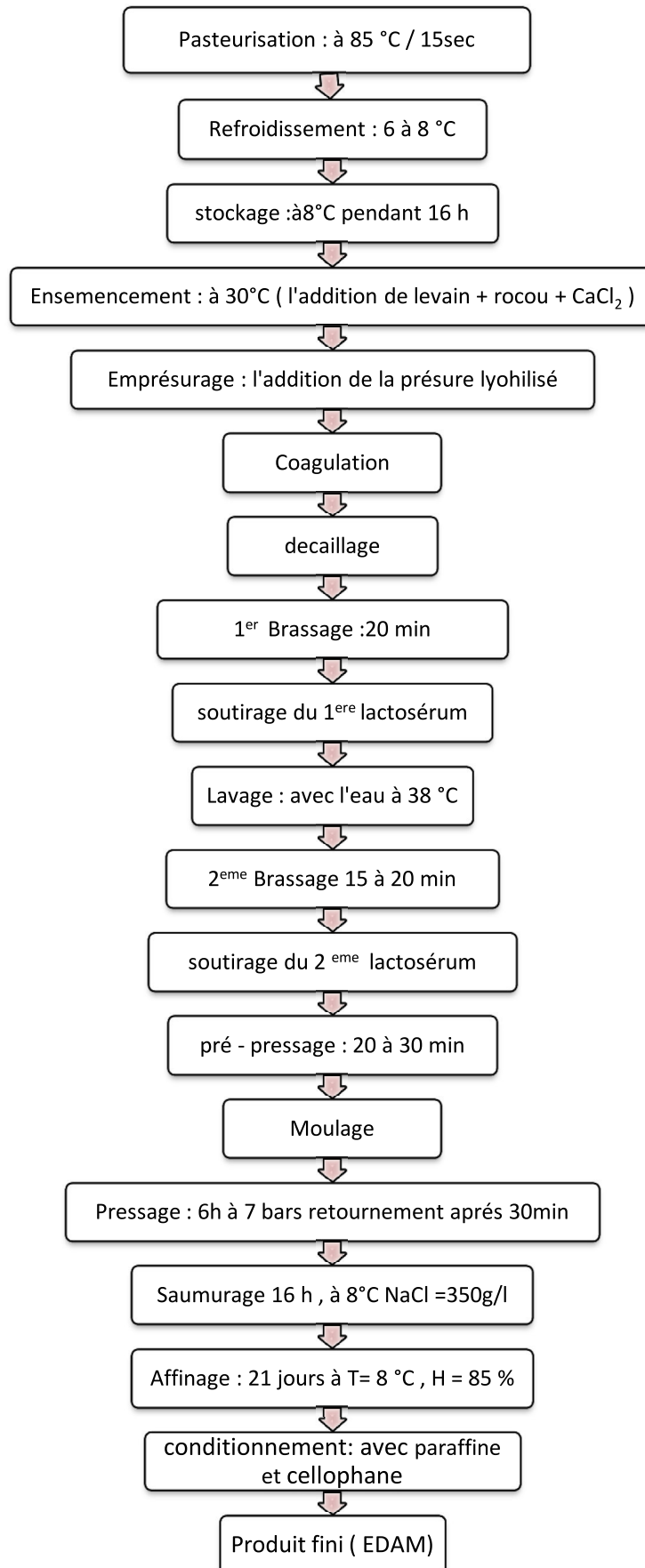


Figure 4: Diagramme de fabrication du fromage à pâte pressée non cuite« EDAM» au niveau de la

Notre travail consiste en la comparaison entre deux protéases, l'une d'origine végétale et l'autre d'origine microbienne (fongique).

La partie expérimentale a été réalisée aux laboratoires de technologie alimentaire à la faculté M'hamed Bougara faculté des sciences de l'ingénieur puis à la laiterie fromagerie de Boudouaou pour la fabrication de fromage.

Les différentes étapes sont présentées dans ce chapitre.

- La préparation des milieux de culture et repiquage de la souche au niveau du laboratoire de microbiologie de la F.S.I.
- La préparation des milieux de fermentation, ensemencement et incubation (cas des microorganismes).
- Préparation de la matière première (cas de végétal graines de citrouille).
- L'extraction d'enzyme coagulant le lait dans les deux cas.
- La détermination de l'activité enzymatique de nos extraits bruts (végétal et microbien).
- La caractérisation des extraits enzymatiques bruts.
- Des analyses physicochimiques et microbiologiques du lait cru utilisés dans la fabrication de fromage au laboratoire de la L.F.B.
- L'essai de fabrication de manière artisanale de fromage avec nos extraits enzymatiques à la L.F.B.
- Des analyses physicochimiques et microbiologiques du produit fini à la L.F.B.

1-Matériel :**Tableau 7 :** Matériel biologique et non biologique.

Appareillage	Verrerie	Les produits et les réactifs
-agitateur magnétique. -autoclave (TRADE RAYEP). -étuve d'incubation (MEMMERT). -bain marie (FLAC, WB-M15). -centrifugeuse réfrigérée (HERMLE/Z-323 K). -balance analytique (SARTORIUS). -pH-mètre -spectrophotomètre UV/VIS (JASCO V-530). -Bec bunsen.	-boîtes de pétri. -Erlenmeyers. -entonnoirs. -éprouvettes graduées. - fioles. -pipettes. -pots pour la conservation de l'inoculum. -tubes à essai. -anse de platine.	-acétate de sodium. -acétate sodique 0,1 normale. -acide acétique. -Bovine sérum albumine (BSA). -carbonate de sodium anhydre. -Eau distillée stérile. -Eau distillée. -lait écrémé en poudre. -milieu PDA (annexe 1). -réactif de folin. -solution de chlorure de sodium à 0,9 %. -sulfate d'ammonium. -solution tampon (PH 5.2 – 0.2 M) (annexe 4). -sulfate de cuivre. -tartrate double de sodium.

1-2-Matériel biologique :

Le lait utilisé dans ce travail est du lait écrémé en poudre type *low -heat*. Pour déterminer l'activité coagulante selon la méthode de Berridge et du lait cru pour la fabrication de fromage type *EDAM*.

La souche *Mucor* a été isolée à partir de la terre se trouvant à proximité de la laiterie fromagerie de Boudouaou et identifiée par (Mme S.Talantikite), parmi tous les microorganismes isolés ; cette souche a été sélectionnée pour sa bonne production d'enzyme coagulante. Cette souche était conservée à température 4°C sur gélose PDA préparé au niveau de laboratoire.

2-Méthodes :

2-1-cas de l'enzyme d'origine fongique :

2-1-1-Revivification de la souche *Mucor circinelloides* :

La revivification de la souche *Mucor* est réalisée en faisant un repiquage à partir de la boîte pétri contenant le milieu gélosé PDA préalablement préparé (annexe 01) dans les conditions d'aseptie. L'ensemencement est réalisé à l'aide d'une anse de platine stérile. Les boîtes de pétri sont incubées à la température 30°C pendant 7 jours.

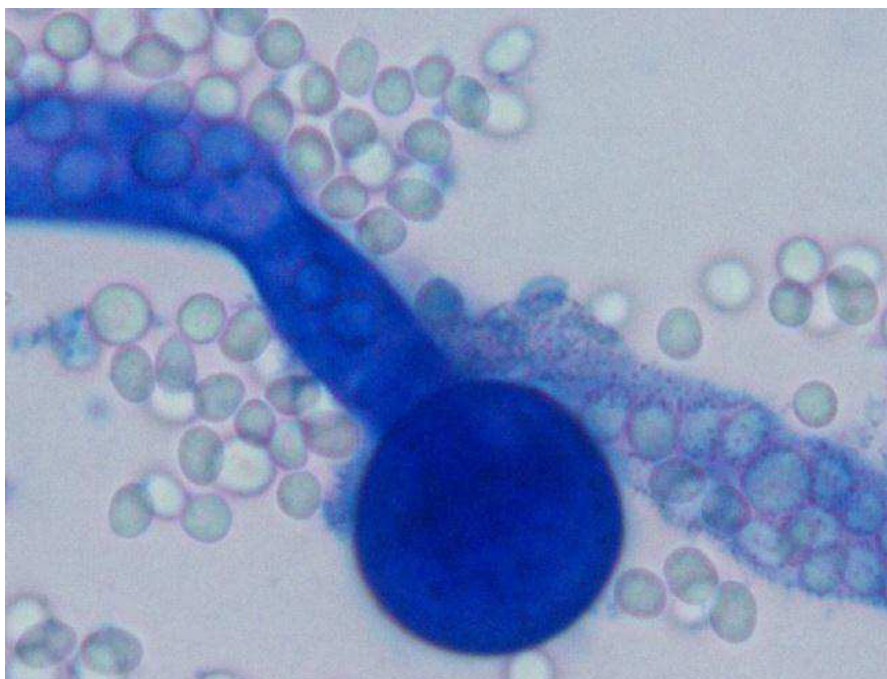


Figure 5 : *Mucor circinelloides* (Talantikite S, 2015).

2-1-2-Préparation de l'inoculum :

Après l'incubation, les spores sont libérées à l'aide d'une solution diluée de tween 80 à 0,01% (deux gouttes dans 200 ml d'eau distillée stérile), cette solution permet la libération des spores, on gratte légèrement la surface de la gélose à l'aide d'une anse de platine stérile afin de mettre en suspension les spores. Cette dernière est filtrée sur un papier filtre permettant le passage du filtrat liquide, récupérer le filtrat dans un pot (c'est l'inoculum).

2-1-3-Préparation des milieux de fermentation :

Pour la fermentation, le milieu de culture utilisé est un milieu solide ; il est favorable pour la production des protéases extracellulaires (KUMAR et al. 2005). ce milieu est composé de son de blé qui est riche en cellulose (source carbonée), source azotée et de fibres alimentaires, en protéines et en sels minéraux (Boudouma, 2009), de sulfate d'ammonium et de lait en poudre.

2-1-4-La fermentation :**Mode opératoire :**

Le milieu utilisé a été optimisé par des travaux antérieurs. Dans chaque ErlenMeyer on met 30 g de son de blé, 2,5 g de poudre de lait écrémé et supplémentés de 60 ml de sulfate d'ammonium à 0,01 %.

Les Erlenmeyers sont bouchés avec le coton cardé enveloppé dans un filet de gaze et recouverts de papier aluminium (qui assure une bonne étanchéité et supporte les hautes températures sans inconvénients), ensuite, stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes. Après la stérilisation et le refroidissement Devant un bec bunsen introduire dans chaque Erlen contenant le milieu, 10 ml d'inoculum contenant 9.10^8 spores/ml déterminées par la cellule de malassez on incube à 30°C pendant 7 jours, Nous avons préparé 4 Erlens. (Annexe 7).

2-1-5-Extraction d'enzyme coagulante :

Après 7 jours d'incubation, la formation des spores est remarquée à la surface des milieux, l'extraction d'enzyme est réalisée par l'addition de 70 ml d'eau distillée stérile dans chaque Erlenmeyer, elle est suivie d'une agitation de 120 tours/min pendant 45 mn à l'aide d'une étuve rotative, le mélange est filtré sur une bande de gaze, entreposée sur un entonnoir, et enfin, le filtrat est soumis à une centrifugation à 10000 tours/minute pendant 20 mn à 4°C. Les surnageants sont récupérés et constituent **l'extrait enzymatique brut**, conservés à 4 °C pour la détermination des activités coagulantes et protéolytiques et aussi pour déterminer ses caractérisations pour la fabrication du fromage *EDAM*.

La figure 6 représente les différentes étapes suivies pour l'obtention de l'extrait enzymatique brut d'origine fongique.

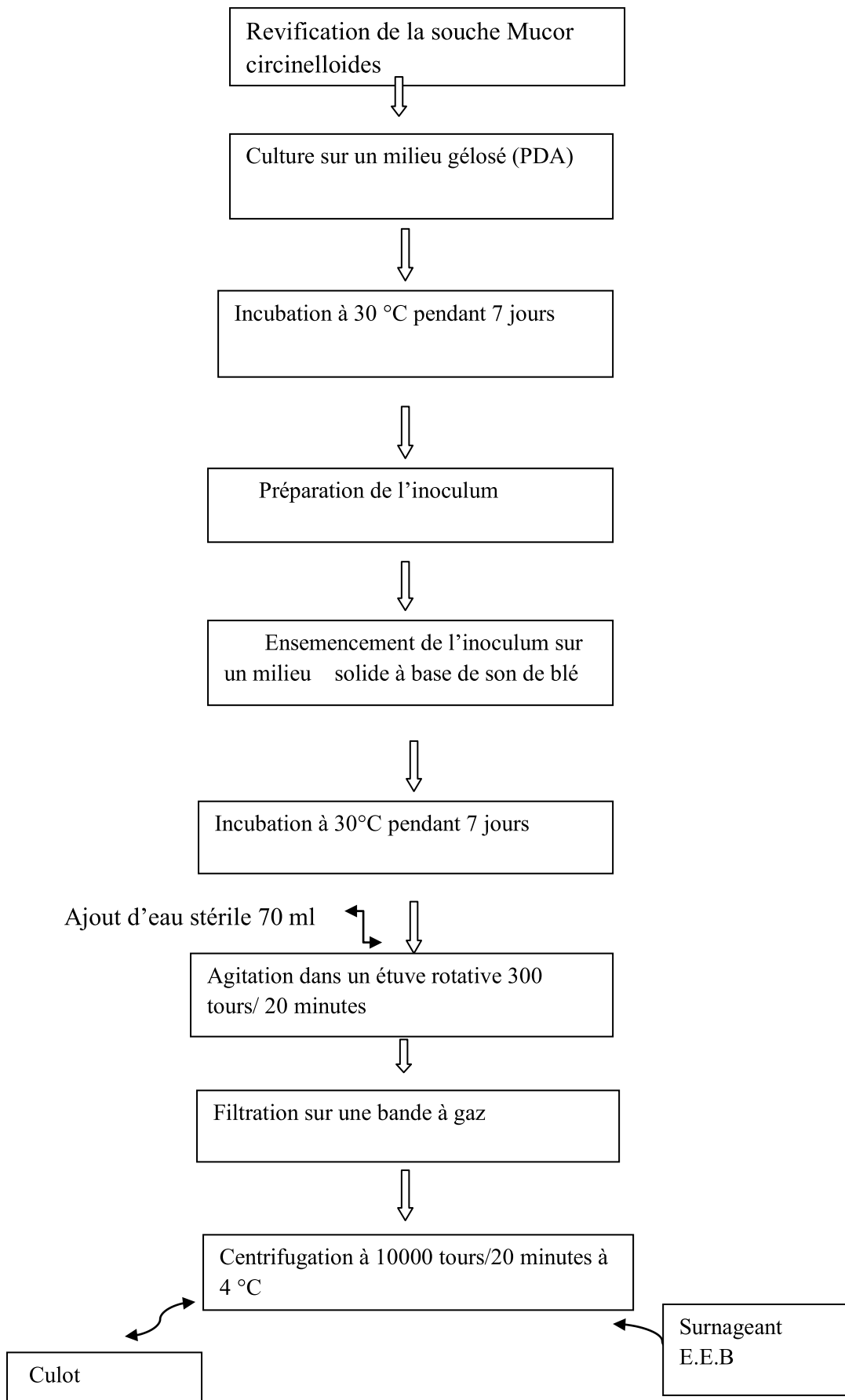


Figure 6 : obtention de l'extrait enzymatique brut (E.E.B)

2-2-cas de l'enzyme d'origine végétale :

2-2-1-origine de la matière première :

La citrouille est un légume très cultivé durant la saison d'été et très consommé surtout au nord d'Algérie pendant la période estivale.

La Curiosité, nous a conduit à étudier ces graines et les utiliser comme source de succédanés de présure.

Ces graines ont l'avantage d'être une matière qui ne concurrence aucun secteur de production, de ce fait son utilisation comme source d'enzyme sera la valorisation de cette matière.

2-2-2-préparation de la matière première :

Après la collecte des graines de citrouille diverses opérations vont se succéder pour que ces graines soient prêtes à l'emploi, dans un premier temps un lavage à l'eau courante a été effectué, puis un séchage durant deux semaines à température ambiante (20°C à 25°C) et à l'ombre des rayons solaires dans un endroit bien aéré et dans un environnement chaud et très sec, pour obtenir des graines bien séchées.

Nous recherchons l'enzyme dans les divers compartiments de cette dernière à savoir la graine entière, le tégument et enfin l'amande c'est l'étape de décorticage. Ensuite chacune de ces parties a subi un broyage. Les extraits farineux obtenus sont conservés au congélateur pour la suite des expériences.

2-2-3-Extraction de système enzymatique :

L'extraction est un procédé qui consiste en la libération des enzymes des cellules ou constituants cellulaires (Nadhour, Belloul, 2003).

Pour l'extraction des protéases des graines de citrouille nous avons suivi deux grandes étapes une chimique et l'autre mécanique :

La première se résume à une homogénéisation des extraits farineux dans trois solvants d'extractions.

Le premier solvant est le tampon acétate de Na, 1 M, pH=5, le deuxième est le tampon citrate de Na à (1M), pH=5 et le troisième solvant est une solution salée de 0,9% de NaCl (annexe 8).

La deuxième grande étape se résume en deux opérations : une congélation et une décongélation.

La congélation s'effectue à une température -18 °C qui peut durer de 24 à 48 h suivie d'une décongélation à une température ambiante 20 à 25 °C pendant 1 à 2 h , ce refroidissement brusque de notre mélange provoque des cassures dans les membranes des cellules facilitant ainsi la libération de leur contenu (**Laurent , 1974**).

On procède ensuite à une macération pendant 3 à 4 h avec une agitation douce, les résidus solides sont écartés après filtration avec du papier filtre ou de la gaze obtenue est centrifugée à 3200 tr / mn pendant 15 mn, Le surnageant est ensuite récupéré après filtration avec du papier filtre et va être conservé au congélateur à -18 °C pour la suite des expériences (**Fernani ,2002**).

La figure 7 Représente les différentes étapes pour l'obtention d'extrait enzymatique brute d'origine végétale.

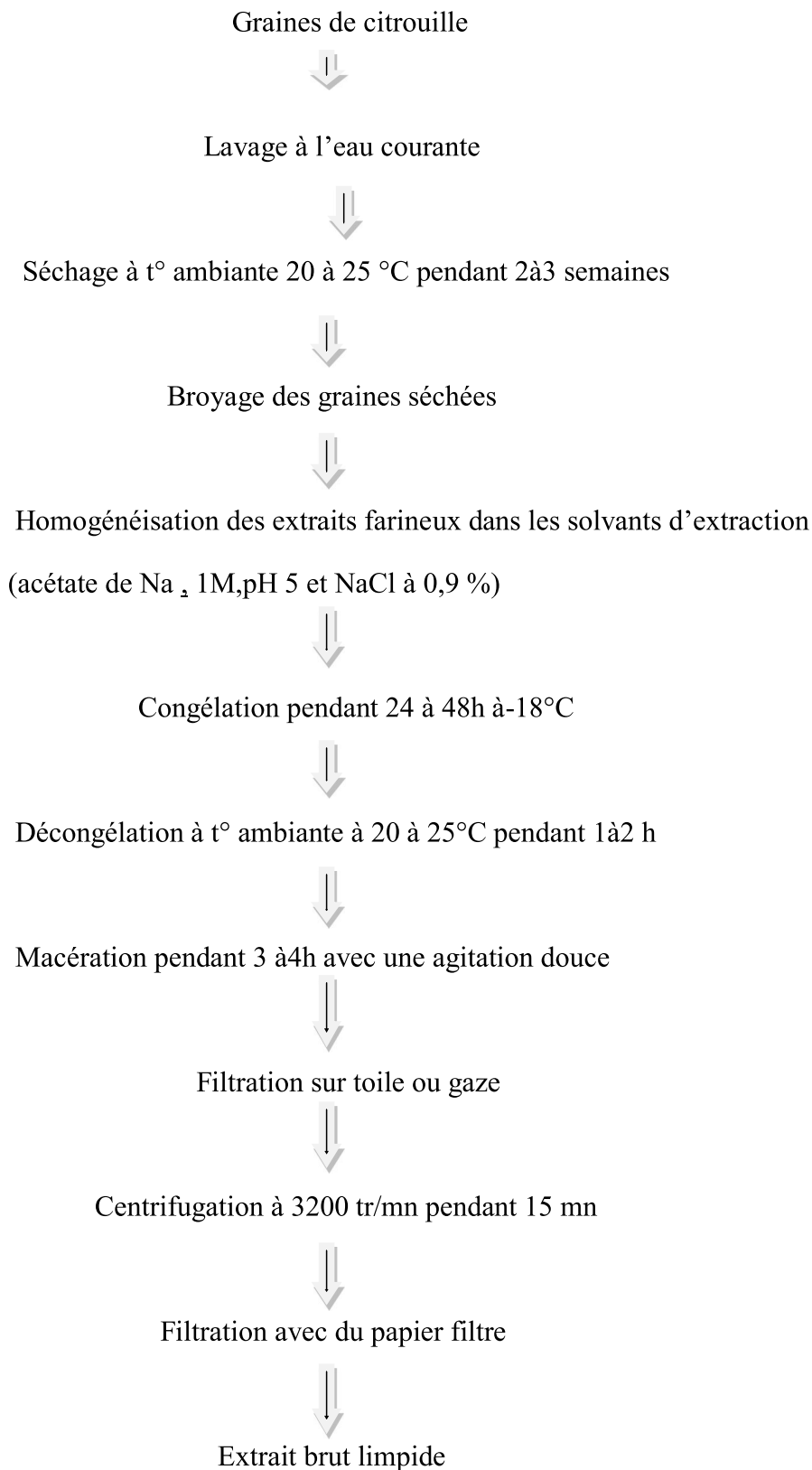


Figure 7: les principales étapes de l'extraction du système enzymatique brut de graines de citrouille (Fernani, 2002)

3-Détermination des activités enzymatiques :

3-1-Activité coagulante :

3-1-1-Préparation du substrat de Berridge :

Le substrat de Berridge est déterminé par la dissolution de 12 g de la poudre de lait type low -heat dans 100 ml de solution de chlorure de calcium ($[CaCl_2] = 0,01 M$), le pH est de 6,4 la solution est soumise à une agitation pendant 30 mn puis laisser à l'obscurité 30 minutes, le lait écrémé ainsi reconstitué, est appelé substrat de Berridge .

3-1-2-Mesure de l'activité coagulante :

Dans des tubes à essai introduire 10 ml de substrat de Berridge puis placées dans un bain marie à 30 °C pendant 30 minutes en présence d'un témoin, donc le temps de floculation est l'intervalle de temps, compris entre le moment de l'addition de l'extrait enzymatique jusqu'à l'apparition de fins flocons sur la paroi interne du tube à essai.

L'unité d'activité coagulante (U.A.C) ou l'unité présure (U.P) est définit par la quantité d'enzyme par millilitre d'extrait enzymatique qui provoque la floculation de 10 ml de substrat de Berridge en 100 secondes à 30 °C (**BERRIDGE ,1955 ; ALAIS, 1974 ; RAMET, 1997**) elle est calculée comme suit :

$$U.P/ml = (100 \times V1) / (10 \times T \times V2)$$

Où:

V1 = volume de lait utilisé (10 ml)

V2 = volume de l'extrait enzymatique utilisé (1 ml)

T = temps de coagulation (s)

100 = 100 sec

10 = 10 ml de substrat

3-2-2-La Force de coagulation :

Afin d'évaluer la force de coagulation, on utilise la méthode de **Soxhlet** décrite par (**Alais, 1984**), cette force représente le volume de lait coagulé (10 ml) par le volume d'extrait enzymatique (1 ml) en 40 min (2400 sec), à 35°C et pH =6,4.

La force coagulante est obtenue par :

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

Où :

F : force coagulante (US) : unité soxhlet.

$$2400 = 40 \text{ min} \times 60 \text{ sec}$$

V : volume de lait utilisé (10 ml) à pH 6,4 à 35 °C.

v : volume de la préparation enzymatique.

T : temps de coagulation en seconde.

En pratique, la force est exprimée par le rapport du volume en litre de l'extrait enzymatique à celui du lait coagulé. Ainsi, un extrait de force 1/10000 signifie qu'un litre de l'extrait enzymatique provoque la coagulation de 10000 litres de lait à 35°C pendant 40 min (**Alais1974**).

3-2-Détermination de l'activité protéolytique de solution enzymatique brute :

L'activité protéolytique est déterminée par l'utilisation de la caséine comme substrat dans les conditions adaptées par **Murado. (Murado et al., 1993)**. (Annexe 5) .elle permet d'évaluer le taux de dégradation du substrat (caséine) pendant la réaction primaire.

La mesure de l'activité protéolytique est fondée sur l'intensité de la protéolyse des caséines sous l'action enzymatique de ces extraits (**Bergere JL, Lenoir J., 1997**).

L'hydrolyse enzymatique des caséines aboutit à la libération de peptides de faibles poids moléculaires qui sont séparés des caséines non dégradées par addition d'acide trichloracétique(TCA) à 5%. A cette concentration, le TCA permet la défécation de tous les peptides en ne laissant en solution que ceux de faible poids moléculaire (**Bengana ,2001**). Après filtration, la mesure de l'absorption à une longueur d'onde 660 nm

par rapport à la tyrosine permet d'apprécier la richesse en peptides du filtrat obtenu, celle-ci étant proportionnelle à l'activité protéolytique. La courbe d'étalonnage de la tyrosine est représenté sur la figure 30.

Les résultats sont exprimés en μg de tyrosine libérés par 1 ml d'extrait enzymatique pendant 10 minutes de digestion (U) par rapport à une courbe d'étalonnage de la tyrosine.

4-Dosage des protéines de solutions enzymatiques brutes :

Le dosage des protéines dans les solutions enzymatiques est effectué par la méthode de **Lowry (Lowry et al .1951)** (annexe 6).

➤ Principe :

La méthode de Lowry consiste à complexer par le cuivre en milieu alcalin environ un quart des acides aminés constituant les protéines. L'addition du réactif de folin-ciocalteau, qui interagit avec cette protéine cuivrique est suivie du développement en 30 minutes d'une réaction colorée bleu strictement proportionnelle à la quantité de protéines présentes, les espèces réduites absorbent à 660 nm. à cette longueur d'onde, le spectrophotomètre donne une valeur de densité optique (DO) qui permet de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon analysé en se référant par projection à une courbe d'étalonnage $DO = f(c)$ où l'albumine sérique bovine (BSA) commerciale est utilisée comme protéine étalon.

5-Characterisation de l'extrait enzymatique brut :

L'activité coagulante optimum sur le lait des différents extraits brut en fonction d'un certain nombre de paramètres est déterminée par la mesure du temps de coagulation du lait additionné de l'enzyme brut.

La mesure de l'activité ou du temps de coagulation sous ses différents paramètres à savoir : pH, température et concentration en CaCl_2 du lait est déterminée en observant le temps de coagulation du lait en faisant varier les paramètres étudiés.

5-1-Influence du pH du lait :

Le pH optimum de coagulation du lait est évalué en observant le temps le plus court de coagulation du lait à différents pH, additionné de la solution enzymatique. Le pH varie alors de 5,2 à 7 avec un pas de 0,2 ; les autres paramètres sont fixés selon les conditions standards.

5-2-Influence de la concentration en CaCl_2 :

La concentration en CaCl_2 du lait qui favorisera un temps de coagulation court est déterminé en faisant varier les quantités de CaCl_2 de 0,005M à 0,08 M avec un pas de 0,02 M. les autres paramètres sont fixés selon les conditions standards.

5-3-Influence de la température :

La température optimale de coagulation ou d'activité coagulante est déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait à des températures variant de 20 °C à 95 °C , avec un pas de 10°C , tous les autres paramètres sont établis selon les conditions standards.

6-Essai de fabrication de fromage type EDAM au niveau de laboratoire de l'unité L.F.B par l'extrait enzymatique (d'origine végétale et l'autre d'origine microbienne) :

Dans le laboratoire de LFB. On a procédé à trois essais de fabrication de fromage, 100% présure, 100% extrait enzymatique d'origine végétale, 100% extrait enzymatique d'origine microbienne.

6-1-Matériel (pour la fabrication du fromage) :

- Une marmite.
- Une louche.
- Une pipette de 2 ml.
- Une spatule.
- Une éprouvette graduée.
- Des toiles.

- bécher.
- Couteau.
- Des petits moules.
- Des bandes à gaze.
- Couscoussier.

7-la Fabrication :

Pour la fabrication de fromage type EDAM nous avons utilisé 5 l de lait cru pasteurisé, avec des volumes des extraits enzymatiques différents pour les trois essais en fonction de la force de coagulation.

Les volumes d'EEB qui sont utilisés dans les essais sont en fonctions de leur force.

Les figures (a ,b ,c) :

a : fromage fabriqué à partir d'E.E.B de *Mucor circinelloides*.

b : fromage fabriqué à partir d'E.E.B de la graine de citrouille.

c : fromage fabriqué à partir de la présure.

7-1) Pasteurisation :

La pasteurisation du lait se fait à température de 85 °C pendant 15 secs, avec une agitation à l'aide d'une louche et ensuite on laisse refroidir à température de 35 °C.

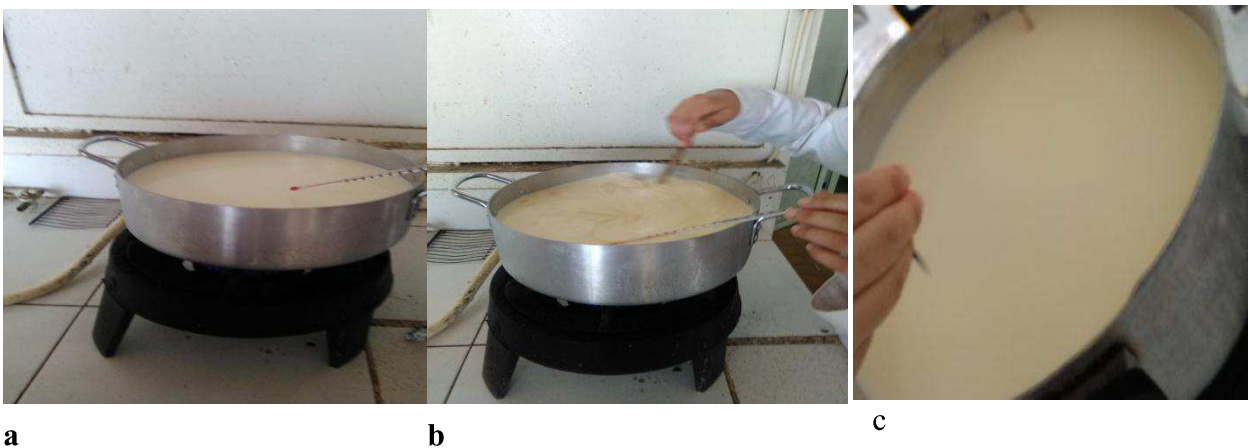


Figure 8 : la Pasteurisation de lait.

7-2) L'ensemencement :

A température de 35 °C, on introduit 1 ml de CaCl_2 , quelques gouttes de rocou et l'addition de 0,05 g de levains (ferments lactiques), on agite puis on laisse reposer juste la température doit être 40°C.

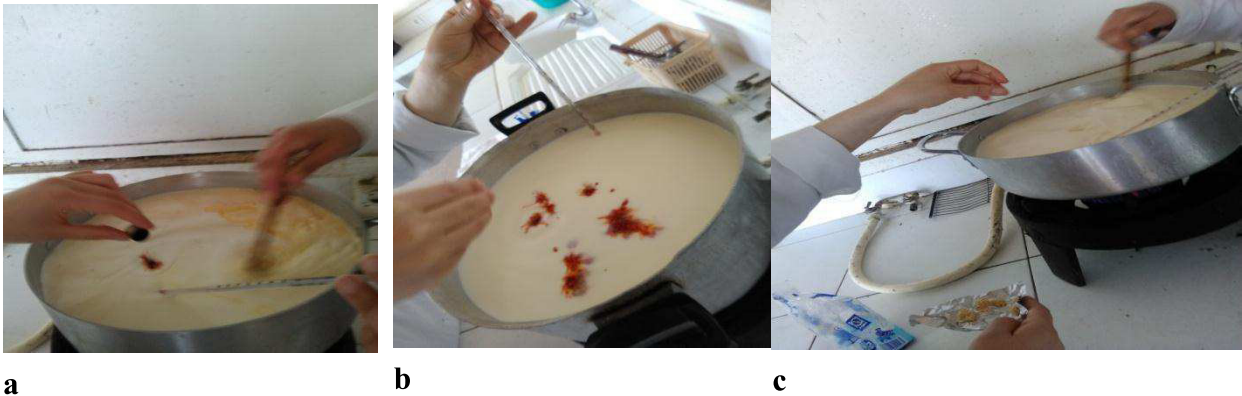


Figure 9 : L'ensemencement.

7-3) emprésurage :

L'emprésurage se fait 20 mn après l'ensemencement lorsque le pH est situé à l'intervalle de 5,5 et 5,45 à température 38 °C et l'addition d'un volume d'extrait enzymatique brut exprimée par son force.

La dose est calculée à partir de la force de coagulation, avec une agitation pendant 5 minutes, on démarre le chronomètre pour exprimer le temps de coagulation.

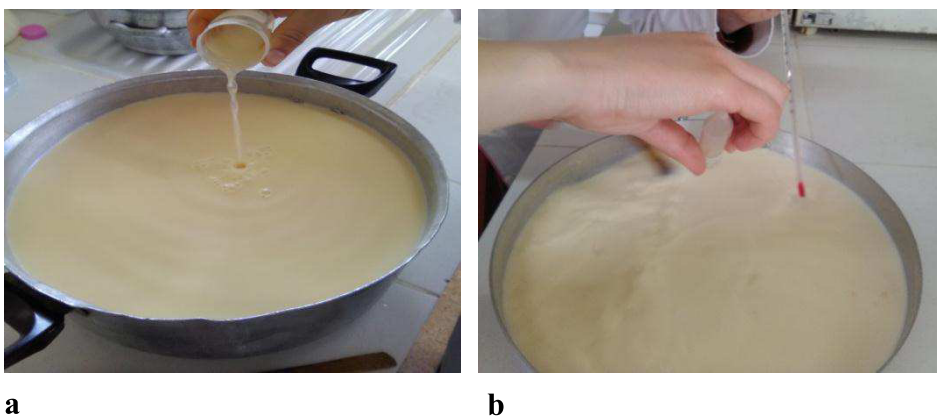


Figure 10 : L'emprésurage

7-4) la coagulation :

Après l'addition de la présure, on va donner un gel, la coagulation. Cette opération dure 25 à 40 min (selon la force de présure utilisée).



Figure 11 : la coagulation (formation du caillé)

7-5) décaillage :

Il est effectué par un couteau à la vitesse la plus faible possible pour limiter les pertes fines car le caillé est encore fragile. Cette opération dure de 5 à 10 minutes jusqu'à l'obtention des grains à la taille d'un grain de maïs.

Le décaillage a pour but d'augmenter l'extrait sec, mais aussi d'augmenter les surfaces d'exsudation de sérum.

Le décaillage se fait en deux temps séparés par 5 minutes de repos (**Luquet, 1985**).

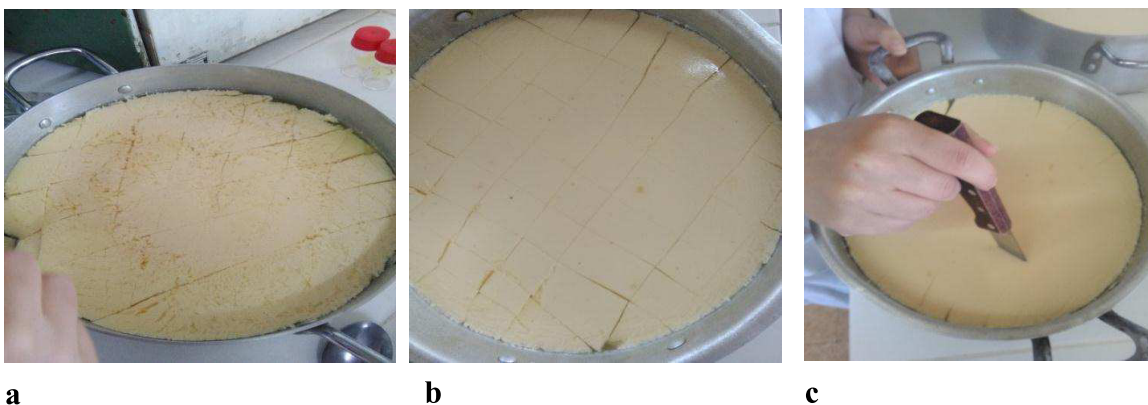


Figure 12 : décaillage du caillé

7-6) brassage :

Le premier brassage s'effectue grâce à une louche, Cette opération consiste à accentuer l'assèchement des grains du caillé durant 15 à 20min selon la quantité du lait. L'opération est ensuite stoppée afin de laisser se déposer les grains au fond de la bassine, puis vient la première évacuation du sérum qui surnage. Ce dernier représente 35-40% du volume total du lait mis en œuvre, son acidité doit être de l'ordre de 10 à 12°D.



Figure 13 : Brassage du caillé

7-7) délactosage :**1^{ière} étape de délactosage :**

A l'aide d'une éprouvette, on remplace le volume de lactosérum 1 avec l'eau de même température.

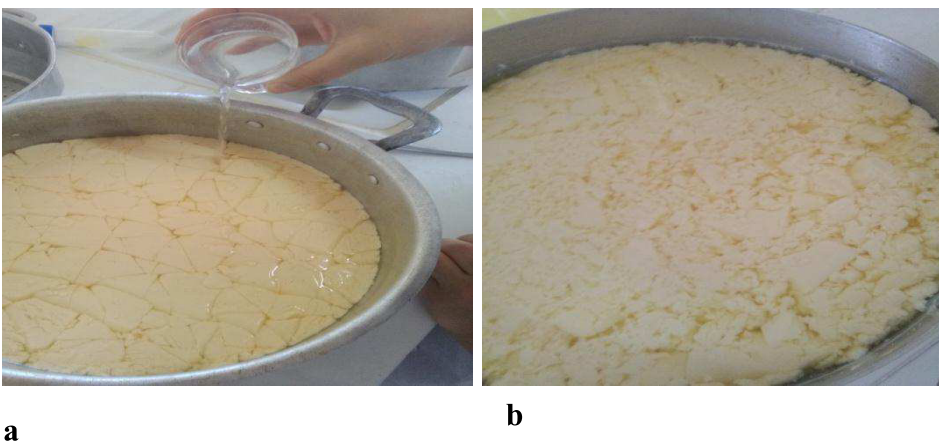


Figure 14 : 1^{ière} étape de délactosage

2^{ième} étape de délactosage :

L'opération de délactosage s'effectue en soutirant une partie du sérum pour :

- * Stopper l'acidification par élimination du lactose restant à la surface ou dans les grains par lavage.
- * Limiter la déminéralisation afin d'obtenir un caillé souple.

Le volume du sérum soutiré est remplacé par la même quantité d'eau.

Le deuxième brassage est effectué aussi par une louche après lavage et chauffage et ceci pour ressuyer les grains et d'augmenter l'extrait sec. Dans ce cas le sérum évacué doit être clair et d'une acidité de 6-8°D. Cette étape dure de 20 à 30min.

La température du mélange caillé-sérum reste dans l'intervalle de 30-34°C et intervient comme facteur d'égouttage (**Luquet, 1985**).

**a****b**

Figure 15 :2^{ième} étape de délactosage

7-8) pré pressage :

Dès que la distribution du caillé est terminée, on fait l'égouttage manuellement avec une bande à gaz dans un couscoussier, pendant 15 mn.

Le fromage subit un pré-pressage Pour compléter l'égouttage.

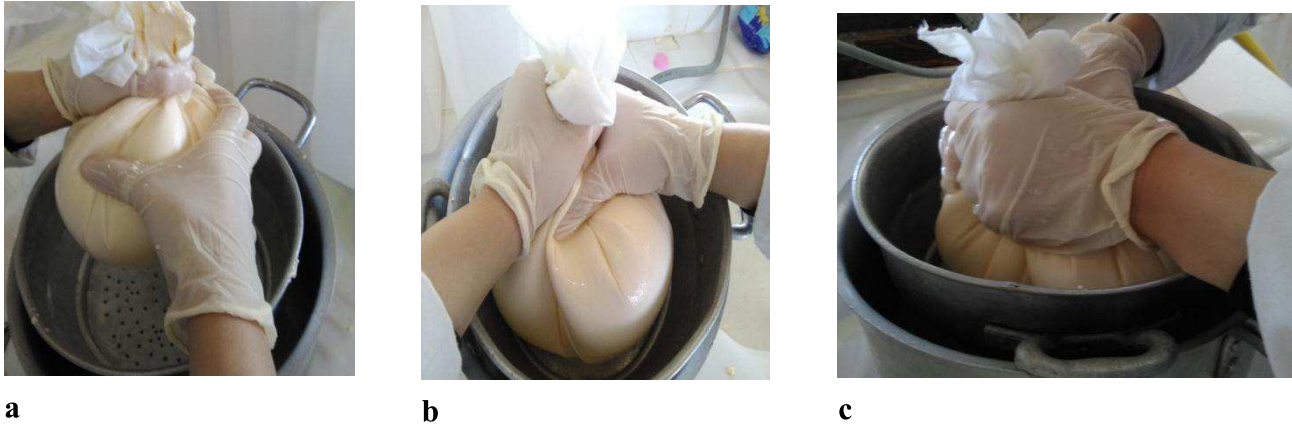


Figure 16 : pré pressage.

7-9) moulage :

Le caillé ainsi formé est récupéré et introduit dans des moules troués, couvert à l'intérieur d'une toile pour permettre un égouttage sans perte de caillé. Le moulage s'effectue pour former une croûte suffisante et évacuer plus rapidement le sérum.



Figure 17 : moulage.

7-10) pressage :

Cette opération a pour but de continuer l'égouttage en augmentant l'extrait sec mais aussi l'acidification de fromage (Veisseyer, 1975). Les fromages moulés sont disposés sous presse pendant deux heures et demie avec une pression de 1-3 bar. Le premier retournement s'effectue après trente minutes.



Figure 18 : pressage.

7-11) démoulage – salage :

Après 2 heures et demi de pressage, on démoule les fromages (qui vont subir un salage par immersion dans un bain de saumure saturé (solution concentrée de NaCl 350g/l) pendant 18 heures. Le but de salage est de donner une saveur à la pâte, continuer l'égouttage et de protéger le fromage par inhibition de certaines bactéries.

Après salage, les fromages doivent être soumis à l'air libre pendant 4 à 8 heures, pour éliminer la pellicule d'eau se trouvant à la surface du fromage qui favorise une prolifération éventuelle de micro-organismes ($T=8^{\circ}\text{C}$, Humidité=30%) (Veisseyer, 1975).

A-démoulage :

b

Figure 19 : démoulage**B-salage :**

a , b , c

Figure 20 : salage**7-12) affinage :**

Au cours de l'affinage, les fromages subissent des transformations physico-chimiques, sous l'action des enzymes naturelles et microbiennes qui leur confèrent leurs caractéristiques organoleptiques (texture, goût et aspect). Cette opération s'effectue en cave à 12-14°C de température et à 85-95% d'humidité relative. Les fromages sont placés sur des planches en bois et sont retournés tous les deux jours. Au niveau de l'unité de Boudouaou les fromages subissent un affinage accéléré de 21 jours au lieu de 3 à 4 mois. Au cours de l'affinage, des soins de croûte sont donnés aux fromages à l'aide d'une brosse

imbibée d'une eau salée. Ces soins visent à empêcher la flore microbienne de s'implanter spontanément en surface, qui est généralement des moisissures (Veisseyer, 1975).



Figure 21 : affinage

7-13) lavage des boules :

Après 21 jours d'affinage, on prend les boules de fromage et on les met dans un bassin d'eau et on les lave avec une brosse imbibée d'un fongicide alimentaire.



Figure 22 : lavage des boules

7-14) grattage des boules :

Les boules sont grattées à l'aide d'un couteau pour éliminer la croûte dure extérieure.



a , b , c

Figure 23 : grattage des boules

7-15) conditionnement :

Les fromages sont ensuite enrobés par la paraffine fondue et portés à 110 – 115 °C, on laisse un certain temps pour sécher puis emballés sous vide dans de la cellophane rouge.

Le stockage des boules de fromage est réalisé dans des hâloirs ventilés à une température de 6°C.

1-paraffine :

Figure 24 : paraffine

2-conditionnement :



Figure 25 : conditionnement.

8- Les Analyses physico –chimiques :

Ces analyses vont nous permettre de connaître les caractères physico-chimiques du fromage obtenu avec les extraits enzymatique bruts (végétal et microbien) et de le comparer aux normes de fabrication de l'unité de Boudouaou.

➤ Pour le fromage :

1- Mesure de pH :

La mesure du pH se fait grâce au pH-mètre en introduisant l'électrode dans le tube contenant le produit.

2- Dosage de l'acidité titrable :

L'acidité titrable est définie comme étant le nombre de millilitres d'une solution d'hydroxyde de sodium à (1/9 M) nécessaire pour neutraliser une quantité du lait (AFNOR, 1986).

Le principe de cette méthode consiste à l'addition d'une solution basique (NaOH) par titration à 10 ml de lait en présence de 3 gouttes de phénolphtaléine qui est un indicateur coloré qui passe de l'incolore en milieu acide au rose en milieu alcalin à $\text{pH} = 8,5$ (Mathieu, 1998).

Dans ces conditions, 0,1 ml de la solution basique définie précédemment, correspond à 1 °D, ce volume neutralisant 10 ml d'une solution d'acide lactique à 0,1 g/l.

Cette méthode est appliquée sur la poudre de lait, lait en cuve, sérum.

3-Dosage de l'extrait sec total :

Le principe de cette mesure consiste à une dessiccation complète de ce dernier jusqu'à obtention d'une masse constante (Mietton ,1986).

Cette mesure se fait à l'aide d'un dessiccateur automatique en introduit de 2 à 2,5 g de fromage sur un papier d'aluminium.

4-Dosage du taux de matière grasse :

Le taux de matière grasse est déterminé par la méthode acido-butyrométrique (Afnor ,1986), cette méthode consiste à dissoudre les éléments du produit excepté la MG du lait ou du fromage par centrifugation dans un butyromètre approprié (butyromètre Gerber pour le lait et le lactosérum, butyromètre Van.Gulik pour le fromage). Cette séparation est favorisée par l'addition de 1 ml d'alcool iso amylique.

Les butyromètres utilisés sont gradués de manière à donner par lecture directe le pourcentage en masse de MG. La teneur en MG exprimée en pourcentage est donnée par la formule suivante :

$$\text{MG}(\%) = n_1 - n_0$$

n_1 : Représente la valeur atteinte par le niveau supérieur de la colonne grasse de butyromètre.

n_0 : Représente la valeur atteinte par le niveau inférieure de la colonne grasse de butyromètre.

5-Détermination de la teneur en chlorure (NaCl) :

le principe de cette méthode consiste à la destruction de la matière organique du fromage par le permanganate de potassium et l'acide nitrique ,puis la détermination de la teneur en chlorure par titrage argent métrique dans une solution d'acide nitrique en présence de sulfate double d'ammonium et de fer (III) (alun de fer) comme indicateur (Afnor,1986).

➤ Pour le lait :**1-Antibiotique :****Principe :**

Le test est basé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or.

Au cours de la première étape d'incubation, les antibiotiques, s'ils sont présents dans l'échantillon de lait, se lient au récepteur.

Pendant la deuxième étape d'incubation, le lait migre sur un support immun-chromatographique qui présente deux bandes de capteur.

- La première bande retient tous les récepteurs qui n'ont pas lié d'antibiotique.
- la seconde bande sert de référence.

Mode opératoire :

On prend un petit flacon contenant des enzymes inactifs, on ajoute 1 ml de lait à analyser, on secoue et on le met dans l'appareil à antibiotique (agitateur), après deux minutes on met une bandelette pour un flacon après 3 mn on pourra faire la lecture :

- si sur la bandelette il y'a apparition de trois traits roses, le test est négative.
- si il y'a apparition d'un seul trait ou bien deux seulement le test est positive.

2-Densité :

Le lait est versé délicatement sur la paroi d'une éprouvette de 250 ml pour ne pas former de mousse.

On remplit l'éprouvette jusqu'à son sommet, de manière que le lait déborde un peu, puis on plonge le thermo – lactodensimètre.

La lecture se fait directement sur l'échelle gradué du densimètre.

$$\text{Si } T > 20^{\circ}\text{C} \quad : \quad D = D_{\square} + 0,2 (T - 20)$$

$$\text{Si } T < 20^{\circ}\text{C} \quad : \quad D = D_{\square} - 0,2 (T - 20)$$

D_{\square} = densité lue sur le lactodensimètre.

T = Température lue sur le lactodensimètre.

3-Acidité :

Principe : l'acide lactique présent dans le lait est titré par la soude en présence de la phénolphtaléine.

Mode opératoire :

On introduit à l'aide d'une pipette 10 ml du lait à analyser dans un bécher et on ajoute 3 gouttes de phénolphtaléine puis on titre avec NaOH jusqu'au virage de couleur rose pale.

Lecture :

La chute de burette correspond à l'acidité exprimée en °D '(degré dornic).

1°D = 0,01 g/l d'acide lactique.

pH :

Le pH est déterminé à l'aide d'un Ph mètre.

4-Matière grasse :

Principe : le lait est agiter dans un butyromètre, avec de l'acide sulfurique et de l'alcool iso amylique.

L'acide sulfurique concentré dissout la caséine et les phosphates insolubles du lait. L'alcool iso amylique facilite la séparation de la matière grasse. Celle-ci liquéfiée par l'augmentation de la température.

Mode opératoire :

On met dans un butyromètre 10 ml d'acide sulfurique, on ajoute 11 ml du lait à analyser à l'aide d'une pipette au contact de la paroi et on ajoute 1 ml d'alcool iso-amylique, on ferme le butyromètre avec le bouchon en caoutchouc et on agite à la main, on met le butyromètre dans la centrifugeuse de 5 à 10 minutes.

Lecture : se fait sur le butyromètre, exprimé en pourcentage.

➤ Pour L'eau :

L'eau à analyser est l'eau de robinet qui déjà traitée, on utilise cette eau dans la préparation de la Saumure, les analyses effectuées sont des analyses préventives et sont :

TA, TAC, TH, pH, dosage des chlorures.

1-Titre alcalimétrique :

Principe : la mesure de TA permet de déterminer la teneur en alcalins et caustique, elle basé sur la neutralisation d'un volume d'eau par un acide minéral dilue en présence d'un indicateur coloré.

Mode opératoire :

Dans un bécher, en introduit 50 ml d'eau à analyser, on ajoute 3 gouttes de phénolphtaléine on titre le mélange avec une solution d'acide sulfurique jusqu'à la dispersion de couleur rose.

$$\text{TA } (^\circ\text{F}) = V_1 \times 5 \times 10$$

V_1 : volume de l'acide sulfurique utilisé par le titrage

$^\circ\text{F}$: degré français

S'il n'y pas de virage cela veut dire que TA = 0

Lecture : le TA exprimée en $^\circ\text{F}$.

2-Titre alcalimétrique complet :

Principe : la mesure du TCA permet de déterminer la teneur en carbonates et en bicarbonates avec le même principe que le TA ainsi sa valeur obtenue par la même formule.

Mode opératoire :

Pour 50 ml d'eau, on ajoute 2 gouttes de méthyle orange, titre avec l'acide sulfurique jusqu'à l'apparition de couleur rouge.

Lecture : le TAC exprimé en ($^\circ\text{F}$).

3-Titre hydrométrique :

Principe : c'est le titrage des ions de calcium Ca^{++} et magnésium mg^{++} et l'indicateur NET.

Mode opératoire :

Pour 100 ml d'eau, on ajoute 12 gouttes de l'indicateur NET et 5 ml de solution tampon ammoniacal, on titre avec l'EDTA (0,01 N) jusqu'à virage de la couleur du violet au bleu.

Lecture : TH exprimé en °F selon cette équation :

$$\text{TH} = V_{\text{EDTA}} \times 2$$

Si on utilise 100 ml d'eau les résultats correspondent à la chute de burette.

4-Dosage des chlorures :

Principe : c'est le titrage des chlorures par une solution de nitrate d'argent en présence d'un indicateur coloré.

Mode opératoire :

On introduit dans une fiole 100 ml d'eau et on ajoute 5 ml de la solution bichromate de potassium qui donne une couleur orange, ensuite on titre avec le nitrate d'argent N/10 jusqu'à l'apparition de la couleur rouge brique.

Lecture : le résultat correspond : $[\text{Cl}] = (V_{\text{AgNO}_3} - B) \times 35,5$

V_{AgNO_3} : est le volume de nitrate d'argent ayant servi au titrage.

B : est le volume de nitrate d'argent nécessaire pour obtenir la même teinte avec un même volume d'eau distillée.

9-Analyses microbiologiques :**9-1-Matériel****9-1.1-Matériel biologique :**

-Le lait.

-Le fromage.

9-1.2-Matériel et Milieux de culture, (Annexe N°07) :

Le matériel et les milieux utilisés dans cette partie sont résumés dans le tableau de l'annexe N°07 aussi, la composition de chaque milieu est représentée dans l'annexe N°08.

9-2-Préparation des dilutions (AFNOR, 1986) :**-Principe :**

Les dilutions primaires (suspension mère) et les dilutions décimales ont été réalisées dans le but de réduire le nombre de micro-organismes par unité de volume, pour faciliter l'examen micro biologique.

Toutes les manipulations sont effectuées avec un maximum de précision et d'une manière aseptique.

9-2.1-Dilution décimales (cas des produits liquides) :

Après homogénéisation convenable de l'échantillon à analyser, 1ml de la solution mère est transféré aseptiquement dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique stérile ceci équivaut à la dilution de 1/10.

Après une bonne homogénéisation à l'aide d'une nouvelle pipette stérile 1ml de cette dernière est transféré dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique stérile, la solution obtenue correspond à 1 /100, pour obtenir la troisième dilution on procède de la même façon.

9-2.2-Dilution primaire (cas des produits solides) :

Elle est réalisée selon les étapes suivantes :

- tarer un récipient stérile qui sera utilisé pour le broyage,
- introduire aseptiquement une quantité d'aliment X g (soit de 25 à 30g),
- ajouter le volume d'eau physiologique nécessaire pour obtenir la dilution voulue (on ajoutera au X g, neuf fois X ml d'eau physiologique).

Cette suspension constitue la solution mère qui correspond à la dilution « 10^{-1} », puis on procédera de la même manière que dans le cas des produits liquides.

9-2.3-Le diluant :

Il ne doit pas induire de variation qualitative sur la flore microbienne présentée, il doit assurer la survie de tous les micro-organismes mais ne doit pas favoriser leur multiplication.

Le diluant utilisé dans notre travail à la LFB est l'eau physiologique.

9-3- Méthodes utilisées :**9-3.1-Pour le lait cru :****9-3.1.1-Dénombrement des germes totaux :****-Principe :**

Ils sont représentés par les germes aérobies mésophiles totaux. On incorpore 1 ml des solutions ($10^{-1}, 10^{-2}$) dans un milieu solide préalablement fondu, standard P.C.A pour dénombrement.

-Mode opératoire :

A partir de la solution mère et les dilutions décimales, porter aseptiquement 1ml dans une boîte de pétrie vide et stérile. Couler 20 ml de la gélose P.C.A fondue puis refroidir à 45°C. Mélanger l'inoculum au milieu en faisant des mouvements circulaires. L'incubation se fait à 30°C pendant 72 heures.

-Lecture :

Les colonies se présentent sous forme lenticulaire en masse. On ne dénombre que les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies.

Pour calculer le nombre de colonies par boîte, on multiplie le nombre trouvé par l'inverse de la dilution.

9-3.1.2-Recherche des coliformes totaux (Petranxiene et Lapied, 1981) :

Les coliformes sont des espèces appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et indiquent le plus souvent une contamination d'origine fécale. L'estimation des coliformes permet d'apprécier :

- L'importance des contaminations du lait cru.
- La valeur et l'efficacité de la pasteurisation.
- Le risque d'une présence de germes pathogènes.

-Principe :

Les coliformes fermentent rapidement la plupart du temps le lactose avec dégagement de gaz, cette fermentation n'est pas particulière à ce groupe d'espèce, elle est rendue plus sélective par l'utilisation d'un milieu aux sels biliaries et au vert brillant.

-Mode opératoire :

On inocule 1 ml de chaque dilution dans 3 tubes contenant le bouillon lactose bilié au vert brillant (B.L.B.V.B) en présence d'une cloche de Durham. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

-Lecture :

Tout tube est considéré comme positif quand la cloche emprisonne au moins 10% de son volume en gaz de fermentation.

Le dénombrement se fait par la méthode du nombre le plus probable (N.N.P).

9-3.1.3-Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (*E. Coli*) (Petranxiene et Lapid, 1981) :

La présence d'*Escherichia. Coli* dans les produits laitiers est le signe le plus certain de contamination fécale.

-Principe :

Le test de **Mackenzie** facilite la détection rapide d'*E. Coli* qui est un indice rapide de contamination fécale, ce test se base sur deux caractéristiques.

-Production d'indole.

-Fermentation du lactose à 44°C pendant 24 à 48 heures avec dégagement de gaz.

-Lecture :

Après la période d'incubation, la lecture consiste à observer d'une part un dégagement de gaz dans la cloche (plus d'1/10 du volume de la cloche) et un trouble (dans les milieux de B.L.B.V.B), et d'autre part un anneau rouge cerise, témoin de production d'indole par *E. Coli* après l'adjonction de 2 à 3 gouttes de réactif de KOVACS dans les tubes, ce qui révèle que les tubes sont positifs et sous-entend une présence des coliformes fécaux (*E. Coli*). L'exploitation de l'ensemble des résultats obtenus s'effectue par la méthode de N.P.P en utilisant la table de MAC GRADY (**Annexe N°09**). Les résultats sont rapportés à 1 ml ou 1 gramme de produit.

9-3.1.4-Recherche de *Staphylococcus- aureus* (Petranxiene et Lapid, 1981) :

La présence de staphylocoques, plus précisément *Staphylococcus-aureus* peut provoquer de graves intoxications parfois mortelles chez le nourrisson.

-Principe :

La recherche des staphylococcus est basée sur l'emploi du milieu Baird Parker contenant

Notamment du jaune d'œuf et du tellurite de potassium.

-Mode opératoire :

On étale à la surface du milieu 0,1 ml de chaque dilution et on incube à 37°C pendant 48 heures.

-Lecture :

Des colonies noires sont obtenues qui sont dues à la réduction du tellurite, le halo clair est due à la protéolyse des protéines du jaune d'œuf et la lisère blanche opaque est due à la précipitation des acides gras produits par la lécithinase qui hydrolyse la lécithine du jaune d'œuf. Pour confirmer la présence de *Staphylococcus aureus* quelques tests biochimiques caractéristiques de l'espèce sont effectués. Les résultats sont exprimés en nombre de germe par « ml » ou « g » de produit.

9-3.3-Pour le fromage :**9-3.3.1- Recherche des coliformes totaux :**

Même mode opératoire que le lait.

9-3.3.2- Recherche des coliformes fécaux :

Même mode opératoire que le lait.

9-3.3.3-Recherche de *Staphylococcus- aureus* :

Même mode opératoire que le lait.

9-3.3.5-Recherche de Salmonella (Petranxiene et Lapied, 1981) :**-Principe :**

Du fait de leur rareté et de l'endommagement des cellules selon les produits, il s'applique un processus de revivification et de multiplication, correspondant à un enrichissement voir à un pré-enrichissement des cellules, ces opérations sont suivi d'isolement sur divers milieux gélosés, sélectifs.

La dernière phase est celle de l'identification des Salmonella isolées de leur sérotypage.

-Mode opératoire :**a- Le pré-enrichissement :**

Dans un Bouillon LactoséMannitoléTamponé (B.L.M.T) pendant 24 heures. Cette phase vise à permettre aux bactéries «stressées » de récupérer leur stabilité (**Beerens et Luquet, 1987**).

b- L'enrichissement :

Il s'effectue après transfert de 1 ml de la culture pré-enrichie dans un volume de 20 ml du milieu sélectif S.F.B.

c-L'isolement :

Cet isolement est effectué sur le milieu gélosé Hektoen.

-Lecture :

Sur ce dernier les colonies suspectées d'être des Salmonelles sont petites, bleu-vertes à centre noir et à contour régulier. Le dénombrement s'effectue par la méthode sur boîte.

Dans cette partie nous allons exposer les résultats obtenus lors de la réalisation de ce travail et de comparer les enzymes d'origine végétale et d'origine fongique. Le végétal utilisé est la graine de citrouille et quant au microbien nous avons utilisé une souche fongique (*Mucor circinelloides*), et leurs applications dans un essai de fabrication du fromage affiné type EDAM.

1-Cas microbien : *Mucor circinelloides*

1-1-Identification de la souche :

L'identification de la souche fait appel à des caractères culturaux et à la morphologie.

1-2-Observation macroscopique :

L'observation de souche incubée à 30 °C en boîte pendant 7 jours, les caractères culturaux :

- Colonie à croissance rapide, extensive, texture laineuse envahie toute la boîte en 7 jours.
- La couleur est blanche au départ, devenant gris en fonction de l'intensité de la sporulation.
- Verso incolore.



Figure 26 : Aspect macroscopique d'une culture de *Mucor circinelloides* sur milieu PDA (30°C, 7 jours).

1-3-Rajeunissement de la souche *Mucor circinelloides* :

Le choix du milieu PDA pour le rajeunissement de la souche a été fait sur la base des données bibliographiques et de plus un milieu qui favorise la sporulation.

1-4-Fermentation :

La croissance de la souche à lieu sur un milieu solide optimisé. Car le milieu solide donne de meilleurs résultats que le milieu liquide. Le *Mucor circinelloides* produit une coagulase avec un rendement élevé seulement en culture solide (Aunstrup, 1980).



Figure 27 : la fermentation.

1-5--Résultats de l'activité et de la force coagulante des extraits enzymatiques bruts d'origine microbienne :

Nous avons déterminé l'activité coagulante et la force de coagulation des extraits enzymatiques bruts des milieux solides selon les conditions (PH=6,5, CaCl₂ 0,01 M, T°=30 °C incubation des milieux de fermentation inoculés pendant 7jours)

La fermentation a été effectuée en 4 exemplaires, nous donne les valeurs moyennes, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : les résultats de l'activité coagulante et la force de coagulation d'E.E.B d'origine microbienne.

N°Erlen	Temps de coagulation (min)	Temps de coagulation (s)	Activité coagulante (UP)	Force de coagulation (SOXHLET)
1	01min 22 sec	82	1,219	292,682



Figure 28 : Les résultats de l'activité coagulante à partir d'extrait enzymatique brut (*Mucor circinelloides*).

2-Cas du végétal (la graine de citrouille) (*cucurbita pepo l.*) :

2-1 -Résultats de l'activité et de la force coagulante des extraits enzymatiques bruts d'origine végétale :

Pour étudier la distribution de l'enzyme dans la graine, on a réduit en poudre les trois compartiments de la graine, à savoir, l'amande le tégument et la graine entière.

La mesure du temps de coagulation par la méthode de Berridge a donné les résultats illustrés dans le tableau 9 suivant :

Tableau 9 : les résultats de l'activité coagulante et la force de coagulation d'E.E.B d'origine végétale :

Lots	Temps de coagulation (secondes)	Activité coagulante(UP)	Force (US)
Graine entière	1200	0,083	20
Tégument	1500	0,066	16
Amande	2700	0,037	8,88



Figure 29 : Les résultats de l'activité coagulante à partir d'extrait enzymatique brut de la graine de citrouille (*cucurbita pepo l.*).

Les résultats rapportés dans le tableau 9 et dans la figure 29, indiquent la présence d'une activité coagulante au niveau de tous les compartiments de la graine, les solutions contenant les extraits enzymatiques ainsi obtenus coagulent le lait au bout d'un temps 45 mn.

Il est donc souhaitable d'utiliser la graine entière comme source d'obtention d'extrait coagulant, du fait que les autres compartiments présentent une force un peu plus faible.

L'extrait brut obtenu à partir de la graine après centrifugation à 3200tr/mn pendant 15mn est un liquide d'une odeur peu prononcée du végétal et d'une couleur jaune clair.

Selon **MORSLI (1981)**, l'activité des extraits dépend de plusieurs facteurs en l'occurrence le stade de développement, mais également de la variété du végétal (**RIFAAT et al, 1970 ; TSOULI, 1974**).

2-2-Détermination de la méthode d'extraction :

Pour mieux caractériser l'extrait enzymatique et pour une meilleure extraction de l'enzyme, nous avons effectué un essai en utilisant deux solutions tampons (nous avons choisi les deux solutions tampons qui ont donné les meilleures activités coagulantes d'après des travaux antérieurs (**Nadhour, Belloul, 2003**). Est qui sont : La solution tampon salée de chlorure de sodium à 0,9 % et l'autre tampon est acétate de sodium à 1M Pour retenir la meilleure méthode d'extraction il faut déterminer le temps de coagulation selon les conditions standard de mesure (T° à 35 °C, pH 6,4, $[CaCl_2]$ à 0,01 M et 1 ml d'extrait enzymatique).

Nous avons employé les différentes méthodes d'extractions, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 10 :

Tableau10 : Temps de coagulation obtenus avec la solution tampon acétate de sodium et la solution de NaCl.

Méthodes d'extraction	Graine entière		Tégument		Amande	
	Temps de coagulation (sec)	Force (US)	Temps de coagulation (sec)	Force (US)	Temps de coagulation (sec)	Force (US)
Na CL 0,9 %	1200	20	1500	16	2700	8,888
Acétate de Na 1M, pH 5	1500	16	2100	11,428	3600	6,666

Selon les résultats, nous constatons que la meilleure solution pour l'extraction de l'enzyme et le meilleur temps de coagulation obtenu est la solution de NaCl à 0,9%.

3-Estimation de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques bruts de *Mucor circinelloides* et l'extrait enzymatique brut de graine de citrouille (*cucurbita pepo l.*) :

Une coloration bleue est développée par les protéines suite à une réaction entre le réactif de Folin et les acides aminés, tyrosine et caséine. Le résultat s'exprime en termes de concentration en tyrosine.

L'activité protéolytique des extraits enzymatiques de *Mucor circinelloides* et de la graine de citrouille est mesurée selon la méthode de (Murado et al 1993). Nos résultats s'expriment en terme de concentration de tyrosine, par référence à un courbe étalon établit à partir de concentration croissante en tyrosine.

Tableau 11 : les valeurs du courbe étalon DO=f [tyrosine] pour la détermination de l'activité protéolytique :

N° Tube	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solution étalon (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Eau distillé (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Solution réactive (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Concentration de Tyrosine (µg/ml)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Do	0	0.2	0.264	0.379	0.465	0.576	0.646	0.71	0.776	0.923	0.936

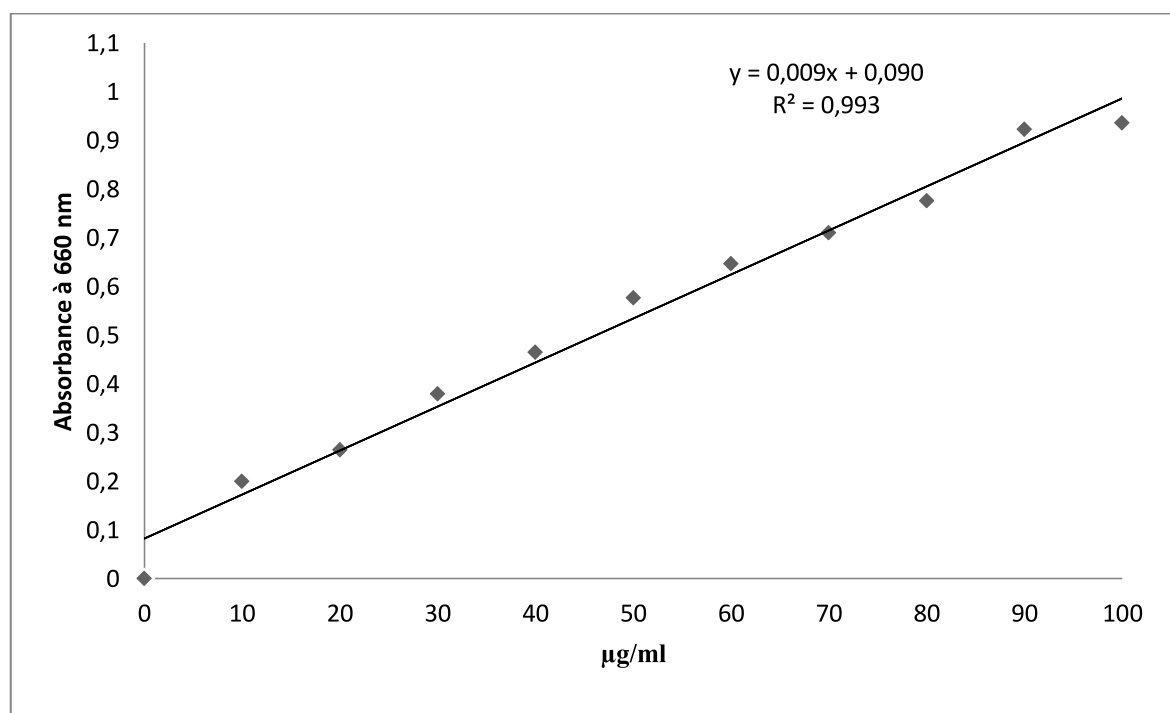


Figure 30 : courbe étalon DO=f [tyrosine] pour la détermination de l'activité protéolytique par la méthode de (Ma Murado et al, 1993).

D'après la courbe d'étalonnage en exprime les concentrations de l'extrait enzymatique brut de *Mucor circinelloides* et l'extrait enzymatique brut de graine de citrouille (*cucurbita pepo l.*).

3-1-L'activité protéolytique :

3-1-1-l'extrait enzymatique brut de *Mucor circinelloides* (fongique):

[C]tyrosine= 15.688 µg /ml/ min

3-1-2- l'extrait enzymatique brut de la graine de citrouille (*cucurbita pepo l.*)(Végétale) :

Tableaux 12 : les valeurs du courbe étalon DO=f [tyrosine] et de concentration de l'activité protéolytique d'E.E.B de la graine de citrouille.

Echantillon	DO	[C] µg	[C] µg /ml/ min
Tégument 1	0.037	11.77	1.177
Tégument 2	0.048	9.33	0.933
Amande 1	0.005	18.88	1.888
Amande 2	0.0052	8.44	0.844
Graine entière 1	0.119	6.44	0.644
Graine entière 2	0.426	74.66	7.466

Au cours de la coagulation du lait, il est impératif de connaître le degré de protéolyse engendré par les enzymes (végétal et microbien).

En effet, certaines de ces activités protéolytiques peuvent par la suite affecter le rendement fromager due à une forte attaque des caséines avec libération de substances peptidiques solubles dans le sérum, ayant pour conséquence une tension très faible du coagulant, un ralentissement de l'égouttage, et l'apparition de gout et de texture anormale à l'affinage en particulier l'amertume associée à une texture molle.

A partir des résultats obtenus on peut observer une évolution de l'activité protéolytique, donc l'extrait de la graine entière de tampon de NaCl développe une production importante d'hydrolyse de caséine par contre l'activité protéolytique enzymatique fongique (*Mucor circinelloides*) manifestent une activité plus grande que le végétal (*cucurbita pepo l.*).

4-Dosage des protéines de l'extrait enzymatique brut (fongique et végétal) :

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants est réalisé selon la méthode de **Lowry et al (1951)**. la concentration est déterminée à l'aide d'une courbe étalon de sérum d'albumine bovine (B.S.A).

Tableau 13 : Préparation des dilutions pour l'élaboration du courbe étalon de la BSA.

N° Tube	0	1	2	3	4
Solution étalon (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8
Eau distille (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2
Solution réactive (ml)	5	5	5	5	5
Concentration de BSA (µg/ml)	0	100	200	300	400
Do	0	0.174	0.307	0.422	0.559

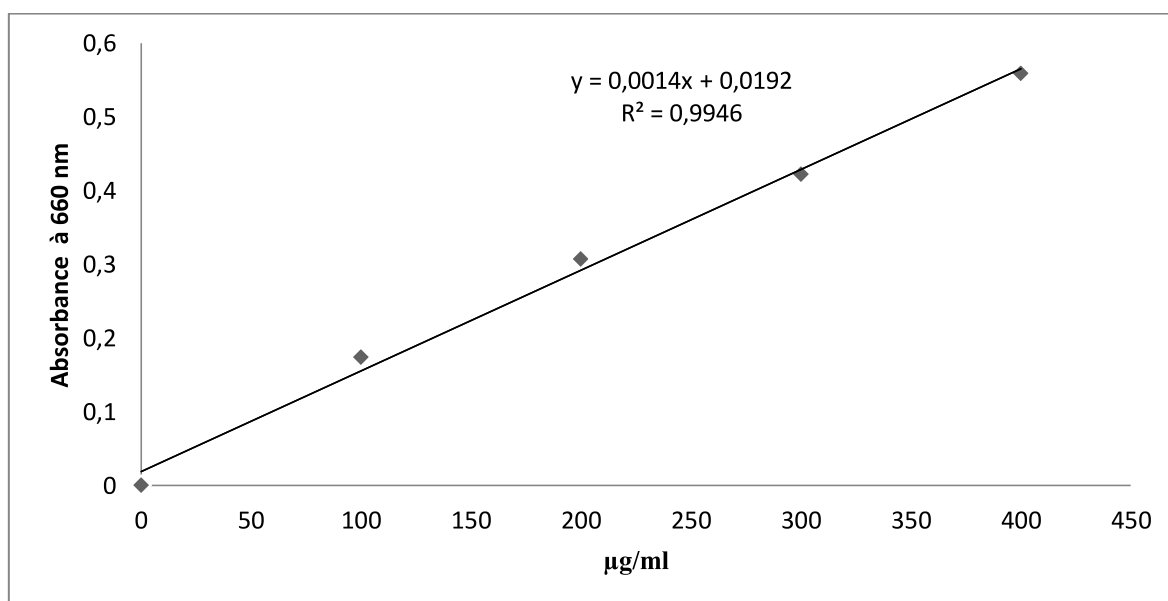


Figure 31 : courbe étalon DO=f [B.S.A] pour le dosage des protéines par la méthode de **LOWRY et al, (1951)**.

4-1-Dosage des protéines de l'extrait enzymatique brut de *Mucor circinelloides* :

[C] B.S.A= 5077.14 µg /ml ou 5 mg/ml.

4-2- dosage des protéines de l'extrait enzymatique brut de la graine de citrouille (*cucurbita pepo l.*) :

Tableau 14 : Résultats obtenu de la Densité optique et la concentration de B.S.A dans l'extrait enzymatique brut de la graine de citrouille des différents compartiments :

Echantillon	DO	[C]µg/ml
Tégument 1	0.184	1177,14
Tégument 2	0.356	2405,71
Amande 1	0.532	3662,28
Amande 2	0.448	3062,85
Graine entière 1	0.798	5562,85
Graine entière 2	0.956	6631,42

Les concentrations en protéines des extraits coagulants bruts issus de l'extraction à 0,9 % sont respectivement de 2405,71 µg/ml, 3062,85 µg/ml, 6631,42 µg/ml présente une concentration en protéines plus importante que celle obtenue par *Mucor circinelloides* 5077.14 µg /ml.

5- Caractérisation de l'E.E.B de *Mucor circinelloides* et de l'E.E.B de la graine de citrouille (*cucurbita pepo l.*) :

5-1- Influence de la température du lait :

Les résultats obtenus de l'influence de la température du lait sur l'activité coagulante et la force de présure sont présentés sur les tableaux 15 et 16.

Tableau 15 : influence de la température du lait sur l'activité coagulante de la protéase de *Mucor circinelloides*.

température	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
Activité coagulante	0,18	0,25	0,44	0,66	1,11	2	3,27	6,25	7,22	8,55	7,88	7,25	6	5,2	4	3,33

Tableau 16 : influence de la température du lait sur l'activité coagulante de la protéase de la graine de citrouille (*cucurbita pepo l.*).

Température °C	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
Activité coagulante	0,06	0,09	0,16	0,211	0,212	0,446	1,53	2,66	3,26	4,04	4,56	5,32	7	5,26	4	3,62

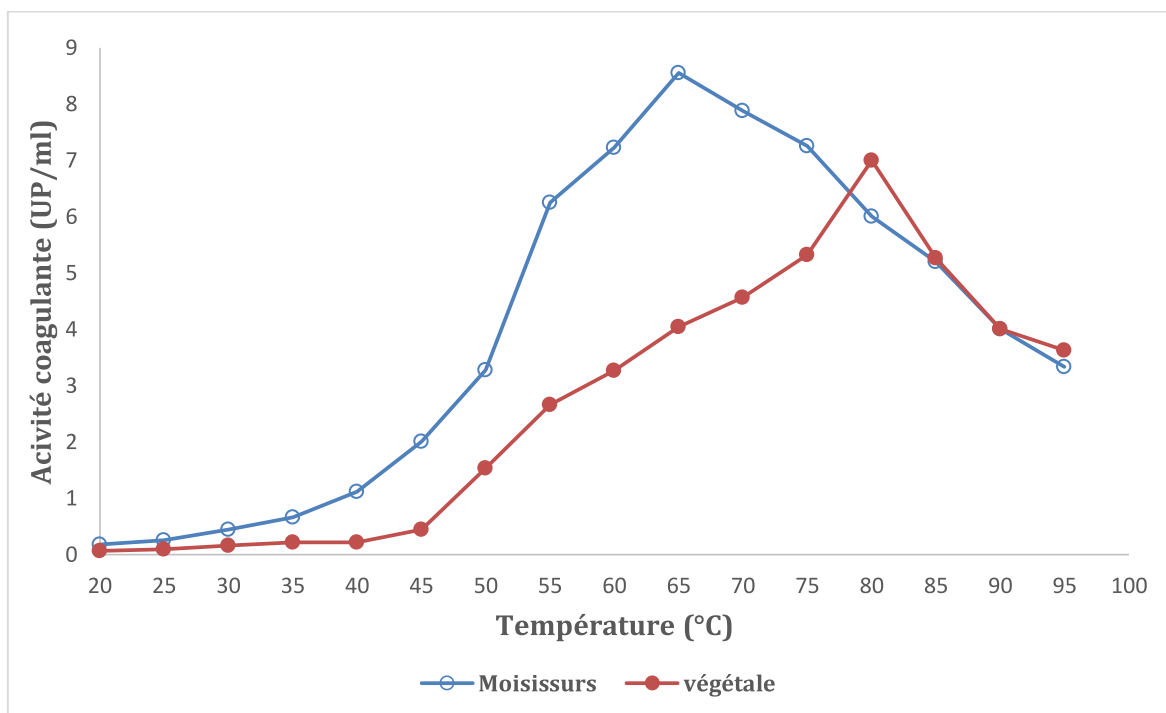


Figure 32 : l'évolution de l'activité coagulante d'E.E.B de *Mucor circinelloides* et d'E.E.B de la graine de citrouille en fonction de la température de lait.

La figure 32 montre que l'optimum de la température d'activité pour *Mucor circinelloides* se situe à 65°C au de la cette valeur, on note une baisse d'activité.

Ces résultats concordent avec ceux de **Houins et al (1973)** suite à des travaux réalisés sur deux moisissures (*Mucor miehei* et *Mucor pusillus*), ils ont constaté une similitude de comportement entres ces deux moisissures avec un maximum d'activité coagulante à une température de 65 °C.

Par ailleurs, **Matoub (2000)** a rapporté une température d'activité optimale de 70° pour la coagulase de *Bacillus subtilis*(LC₃₃).

La température optimale de l'activité enzymatique de la préparation coagulante a été déterminée par la mesure du temps le plus court de la coagulation du lait.

La figure 32 montre que l'optimum de la température d'activité pour le végétal se situe à 80°C, au de la cette valeur, on note une baisse d'activité qui serait la conséquence d'une dénaturation partielle de l'enzyme et de la déstabilisation des micelles du lait.

Nos résultats concordent avec les résultats de **Nadhour, Belloul, (2003)**, elles ont trouvé la température optimale d'activité se situe à 80°C (cas de végétal).

De même l'étude menée par **Morsli (1996)**, sur les extraits issues de l'artichaut, du figuier et du poulet indiquent des optimum d'activité coagulante obtenus respectivement aux températures du lait égales à 60°C ,80°C et 40°C.

Ce qui montre que l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques coagulants est fortement dépendante de leur origine.

5-2-Influence du pH du lait :

Tableau 17 : influence de pH du lait sur l'activité coagulante de la protéase de *Mucor circinelloides*.

Ph	Activité coagulante
5,2	0,425
5,4	0,58
5,6	0,625
5,8	0,694
6	0,833
6,2	0,74
6,4	0,635
6,6	0,557
6,8	0,488
7	0,345

Tableau 18 : influence de pH du lait sur l'activité coagulante de la protéase de la graine de citrouille

pH	Activité coagulante
5,2	0,0364
5,4	0,0476
5,6	0,0593
5,8	0,0664
6	0,072
6,2	0,0846
6,4	0,0925
6,6	0,0505
6,8	0,0325
7	0,0176

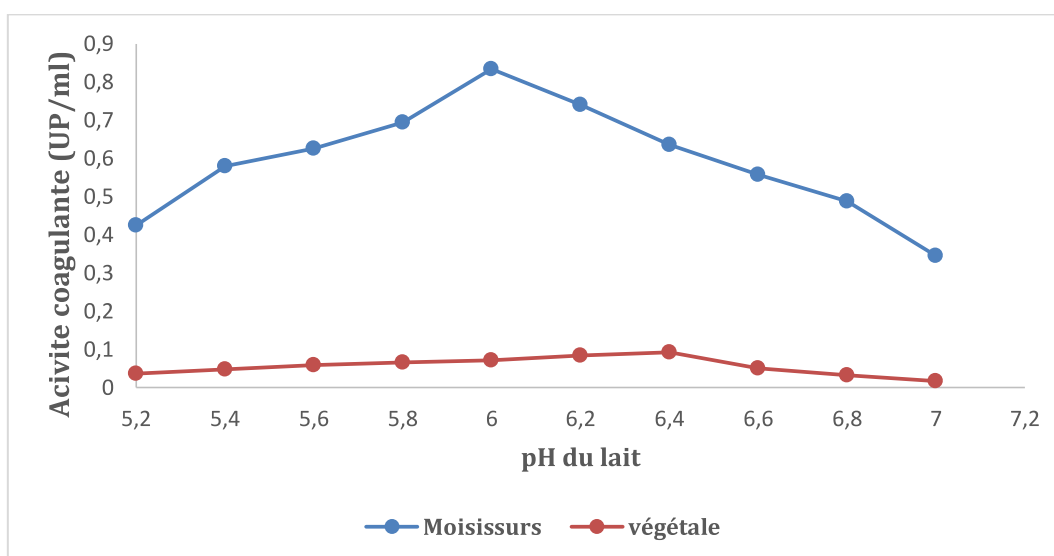


Figure 33 : l'évolution de l'activité coagulante d'E.E.B de *Mucor circinelloides* et d'E.E.B de la graine de citrouille en fonction de pH du lait.

L'activité coagulante de E.E.B augmente d'une manière identique au fur et à mesure que le pH augmente, elle est maximale à pH=6, au-delà de cette valeur l'activité coagulante diminue.

Nos résultats se rapprochent de ceux de **Matoub (2000)** qui indique un pH optimum d'action de 6,2 pour une coagulase produite par une souche locale sélectionnée de *Bacillus subtilis* (LC33) par contre ils sont supérieurs à ceux qui ont été rapportés par **Negi et Benerjee (2009)** qui ont noté une activité coagulante optimale à pH 5 pour une coagulase issue d'une souche d'*Aspergillus niger* variété *awamori* (MTCC 6652).

La recherche de la mesure favorable d'activité de l'enzyme en fonction du pH du lait a été calculé dans un intervalle de pH de 5,2 à 7 la figure illustre ce résultat.

L'activité coagulante des E.E.B augmente d'une manière identique au fur et à mesure que le pH augmente, elle est maximale à pH=6 pour l'extrait enzymatique brut de *Mucor circinelloides* et un pH=6,4 pour l'extrait enzymatique brut de grain de citrouille au-delà de cette valeur l'activité coagulante diminue.

Nos résultats sont proches avec ceux de **Nadhour, Belloul, (2003)**, elles ont trouvé un pH optimum de 6,2.

Effectivement, **Mouzali (2001)** lors d'une étude menée sur la caractérisation de l'extrait coagulant de fleur de carde, indique une action active de l'extrait en question aux pH bas du lait, et qui est de l'ordre de 5,7, cette légère différence entre ses résultats et les nôtres est due sans doute au fait que **Mouzali (2001)** a utilisé une concentration de 5% de NaCl pour l'extraction enzymatique.

L'activité enzymatique est très dépendante du pH. En général, une enzyme possède une zone de pH optimum où son activité catalytique est maximale. De part et d'autre de cette zone, plus ou moins étroite, l'enzyme est progressivement inactivée (**Kamoun, 1997**).

Selon **G.Brulé et J.Lenoir (1981)** l'activité coagulante de la présure est maximale et importante à un pH compris entre 5 et 6,5.

5-3-Influence de la concentration en CaCl_2 :

Tableau 19 : influence de la concentration du lait sur l'activité coagulante de la protéase de *Mucor circinelloides*.

[CaCl_2]	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
Activité coagulante	0,377	0,529	0,625	0,78	0,813	0,74	0,73

Tableau 20 : influence de la concentration de CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante de la protéase de la graine de citrouille

$[\text{CaCl}_2]$	0,005	0,001	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
Activité coagulante	0,011	0,016	0,19	0,351	0,382	0,486	0,412

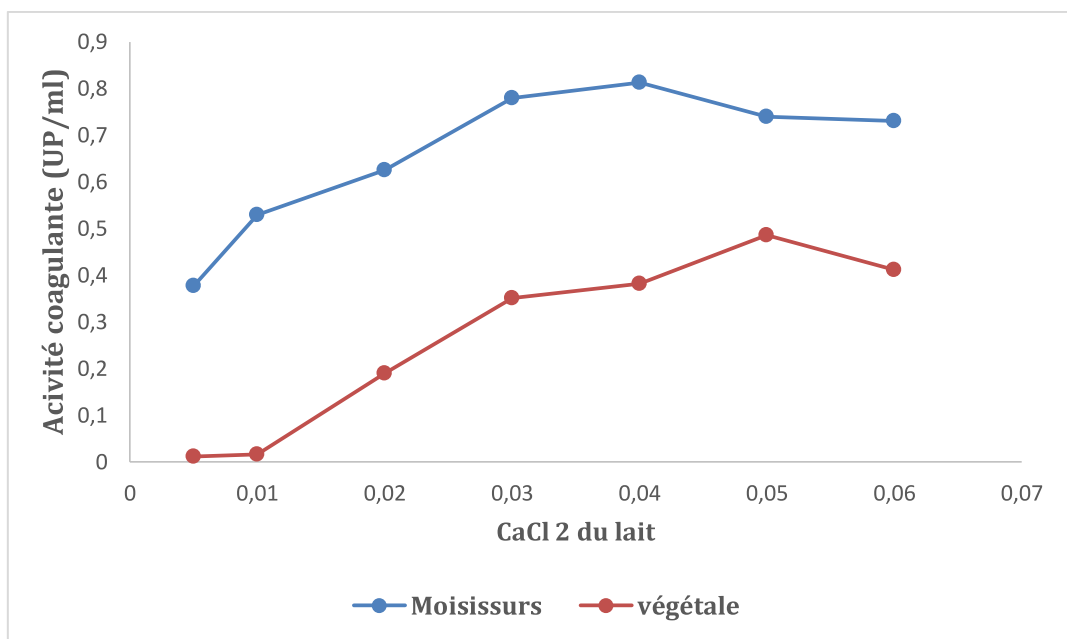


Figure 34 : l'évolution de l'activité coagulante d'E.E.B de *Mucor circinelloides* et d'E.E.B de la graine de citrouille en fonction de la concentration de CaCl_2 de lait.

On observe que l'activité coagulante augmente de manière proportionnelle avec la concentration en CaCl_2 pour atteindre une activité maximale à une concentration de 0,04 M pour l'E.E.B de *Mucor circinelloides*.

Nos résultats concordent avec les travaux de **Merheb-Diniet al. (2010)**, ont noté une augmentation de l'activité coagulante avec l'augmentation de concentration en CaCl_2 . Au-delà d'une concentration de 0,04 M en CaCl_2 l'activité coagulante diminue et cela dans le cas d'une protéase de *Thermomucorindicae-seudaticae*.

De même que les résultats de **Preetha et Boopathy (1997)** concordent avec nos résultats qui ont observé une activité maximale de 0,04 M pour l'enzyme coagulante de *Rhizomucormiehei*.

Chemlal en 1998, a obtenu un optimum d'activité à une concentration de 0.05M pour l'extrait brut issue du *Bacillus coagulans*.

On observe que l'activité coagulante augmente de manière proportionnelle avec la concentration en CaCl₂ pour atteindre une activité maximale à une concentration de 0,05 M en CaCl₂ pour E.E.B de la graine de citrouille.

Le temps de coagulation diminue avec l'accroissement de la [CaCl₂], on remarque dans la figure 34 une baisse de l'activité coagulante par effet inhibiteur de l'ion calcium.

Ces résultats concordent avec ceux de **Nadhour, Belloul, (2003)**, elles ont trouvé l'activité coagulante optimale à une concentration du lait en CaCl₂ égale à 0,06 M.

Cette diminution est due à l'augmentation de la force ionique ou à la saturation des résidus chargés négativement de la micelle due également à l'augmentation de la concentration de Ca²⁺ dans le milieu (**Merheb-Diniet al, 2010**).

Pour notre part, nos résultats ne confèrent pas ceux obtenus par **Tsouli (1974)** et **Morsli (1981)** ainsi que ceux de **mouzali (2001)** qui ont indiqué une concentration optimale de 0,02M ces divergences peuvent s'expliquer par l'origine et l'état pureté de l'enzyme (**Fernani ,2002**).

6-Les analyses physico-chimiques et microbiologiques :

6-1-Les analyses physico- chimiques du lait :

Tableau 21 : Résultats des analyses physico-chimique du lait :

Analyses	Lait cru après pasteurisation	Normes AFNOR(1986)
pH	6,55	6,5
Acidité (°D)	15	15-18
MG (g/l)	30	34-40
Densité	1031	1030-1033
Antibiotiques	Négative	Négative

Les résultats observés après pasteurisation du lait destiné à la fabrication du fromage, sont conformes aux normes **AFNOR (1986)**.

6-2-Les analyses physico-chimiques du lactosérum :**Pour le 1^{er} lactosérum :****Tableau 22** : les résultats des analyses physico-chimique de 1^{ère} lactosérum.

Analyses	100%E.E.B végétale	100% fongique	E.E.B	100% présure	NORME AFNOR (1986)
pH	6,74	6,32		6,55	6,5-6,6
Acidité (°D)	11	13		10	16-18
E.ST (g/l)	65	60		60.24	80+/-4
M.G (g/l)	3	3		4	2-8

D'après le tableau 22, on constate La teneur en matière grasse dans le sérum (I) reste dans les normes (2 à 8g/l) pour nos trois fabrications.

On remarque que les valeurs de pH sont légèrement inférieures aux normes.

Les résultats de l'acidité déterminent une valeur de 11°D, qui ne sont pas conforme à la norme (16 à18) pour la fabrication avec les deux extraits enzymatiques et avec la présure.

La mesure de la teneur en extrait sec totale pour la 1^{er} fabrication (100%E.E.B) et 100% présure présente des valeurs 60 g/l, 65 g/l et 60,24g/l induisent une diminution de la teneur en EST pour la fabrication.

Pour 2^{ème} lactosérum :**Tableau 23** : les résultats des analyses physico-chimique du la 2^{ème} lactosérum

Analyses	100%E.E.B végétal	100% fongique	E.E.B	100% présure	NORME AFNOR (1986)
pH	6,84	6,76		6,84	6,8-6,9
Acidité (°D)	6	6		6	7-8
E.ST (g/l)	50,2	21.4		31.09	40+/-4
M.G (g/l)	2	1,8		2	0-2

D'après les résultats obtenus dans le tableau 23, on constate que les paramètres suivants : pH, l'acidité et la MG du lactosérum (II) correspondent totalement aux normes **AFNOR**.

Pour nos trois fabrications, ce qui impliquera un bon rendement en matière grasse dans le produit fini.

La mesure de la teneur en extrait sec totale dans le lactosérum (II) signale que les valeurs de l'EST, 21,4g/l, 31,09g/l, pour 100% EEB *Mucor circinelloides*, 100% présure respectivement démontrent une diminution en comparaison aux normes **AFNOR**.

Par contre E.E.B de la graine de citrouille correspondent aux normes **AFNOR**.

6-3-les analyses de l'eau de process :

Les résultats sont signalés sur le tableau 24.

Tableau 24 : Résultats des analyses physico-chimiques de l'eau de process.

Paramètres	Résultats obtenus	Normes OMS
pH	7.90	6.5-8.5
TA (°F)	0	0
TAC (°F)	25	22
TH (°F)	21	Max 60
Chlorure (mg/l)	85.20	< 250

D'après ce tableau, les résultats de l'analyse de l'eau utilisée au niveau de la laiterie fromagerie de Boudouaou qui sont de 7.90, 0, 21 et 85.20 de pH, TA, TH et chlorure respectivement sont en partie conformes aux normes. Cependant, la valeur obtenue pour le titre alcalimétrique complet (TAC) (25°F) est légèrement supérieure aux normes OMS (22°F). Cela peut être dû à la charge de cette eau en carbonate alcalin et d'hydrogénocarbonate.

6-4-Pour le produit fini (le fromage) :

Les résultats sont indiqués sur le tableau 25 :

Tableau 25 : résultats des analyses physicochimique du fromage

paramètre	pH	MG (g /L)	EST (g/L)
Essai			
E.E.B <i>Mucor circinelloides</i>	5,18	24	57,39
E.E.B Graine de citrouille	4,90	24,5	46,69
Présure	5,23	21,5	52,9
Normes AFNOR (1986)	5.10-5.40	22-25	53-57

D'après ces résultats, on observe Les résultats de l'EST de 100% présure et 100% E.E.B de *Mucor circinelloides* sont dans les normes mais celle de 100% EEB de la graine de citrouille a inferieure aux normes.

Les résultats de l'EST, indiquent que les valeurs de 57,39, 52,9 de E.E.B de *Mucor circinelloides* et de 100% présure sont conforme aux normes **AFNOR**.

Par contre l'EST de E.E.B. de la graine de citrouille ne conforme pas à la norme **AFNOR**.

7-Les analyses microbiologiques :

Les résultats sont indiqués sur le tableau 26.

Tableau 26 : Résultats des analyses microbiologiques du produit fini.

Germe recherchés	EDAM par E.E.B <i>mucor circinelloides</i>	EDAM E.E.B Graine citrouille	EDAM de présure	Normes selon LFB
Coliformes totaux /g	20	15	20	Absence dans 1g ou ml
Coliformes fécaux /g	Abs	Abs	Abs	Absence dans 1g ou ml
Staphylocoque	0	0	0	Max 100/g ou ml
C.S.R	Abs	Abs	Abs	Absence dans 1g
Salmonelles	Abs	Abs	Abs	Absence dans 25g

Pour commenter nos résultats, on se basera essentiellement sur ceux relatifs aux coliformes totaux et fécaux (*E. coli*), qui donnent des informations sur la qualité hygiénique du produit.

Les résultats observés par les analyses effectuées sur les trois produits au cours de la fabrication, montrent une élévation du taux de coliformes pour le fromage fabriqué à partir de 100% EEB de *Mucor circinelloides*, 100%EEB de graine de citrouille et 100% présure.

8-Comparaison entre les deux extraits enzymatiques bruts :

Tableau 27 : comparaison des résultats entre les deux protéases (fongique et végétale).

Echantillon paramètres	La Teneur en protéines	L'Activité protéolytique	L'Activité coagulante	La force de coagulation
E.E.B <i>Mucor circinelloides</i>	5 mg/ml	15.688 µg /ml/ min	1,219 (UP)	292,682(soxhlet)
E.E.B Graine de citrouille	6mg/ml	7.466 µg /ml/ min	0,083 (UP)	20 (soxhlet)

D'après le tableau 27, on observe que les valeurs obtenues à partir d'E.E.B de *Mucor circinelloides* sont conformes aux normes **AFNOR** par rapport à celles de l'E.E.B de la graine de citrouille.

9-Comparaison entre les pâtes fromagères :

D'après les résultats nous remarquons que :

- La teneur des protéines dans le végétal est plus élevée que le microbien.
- L'activité protéolytique dans le microbien est plus forte que dans le végétal.
- L'activité coagulante pour le microbien est meilleure que pour le végétal.
- la force coagulante est beaucoup plus importante dans le cas de l'enzyme d'origine microbienne.

Conclusion

Cette étude nous a permis de contribuer aux travaux de recherches pré existants dans le domaine de l'industrie fromagère et de renforcer l'idée de pouvoir trouver de nouvelles sources potentielles de succédanés de présure.

Dans la première partie des résultats nous avons obtenu des extraits enzymatiques bruts à partir de la souche *Mucor circinelloides* la souche a été fournie par **Mme Talantikite S** et des Graines de citrouille (*cucurbita pepo* l).

La croissance de la souche a été obtenue sur milieu de fermentation à base de son de blé optimisé par des travaux antérieurs.

Cette étude visant l'extraction et la caractérisation d'une enzyme coagulante issue des graines de citrouille (*cucurbita pepo* L), nous a permis d'avoir une connaissance sur l'utilisation de cet extrait comme succédané de présure du matériel végétal.

Après avoir recherché dans les trois compartiments de la graine (tégument, amande, et la graine entière) nous avons trouvé la meilleure activité dans la graine entière.

Les résultats obtenus sont : de 1,219 (UP/ml) pour *Mucor circinelloides* et 0.08 (UP/ml) pour les Graines de citrouille (*cucurbita pepo* l).

L'activité protéolytique est de 15.688 μg /ml pour *Mucor circinelloides* est de 7.466 μg /ml pour Graines de citrouille (*cucurbita pepo* l), le taux de protéines est de 5077.14 μg /ml pour *Mucor circinelloides* est de 6631,42 μg /ml pour Graines de citrouille (*cucurbita pepo* l).

Les conditions optimales des extraits enzymatiques bruts ont été déterminées et nous avons obtenu pour la température 65°C et pour le pH = 6 et un taux de CaCl_2 de 0.04 M pour *Mucor circinelloides*. Alors que pour les graines de citrouille une température de 80°C, un pH = 6.4 et un taux de CaCl_2 est de 0.05M.

Dans la deuxième partie plusieurs essais de fabrication de fromage affiné à pâte pressée non cuite type « EDAM » ont été réalisés avec les différents extraits enzymatiques obtenus.

Les analyses de ces résultats indiquent que les deux extraits ont une aptitude à la coagulation et peuvent être utilisés comme des succédanés de présure dans la fabrication du fromage mais l'étude comparative entre les deux EEB indique que *Mucor*

Conclusion

Mucor circinelloides a une meilleure activité coagulante , et une plus grande activité protéolytique que la Graine de citrouille qui a un plus fort taux de protéines.

Pour résoudre le problème causé par l'activité protéolytique élevé de nos extraits enzymatique, nous avons cuit le caillé après l'étape de brassage, nous avons obtenu un caillé de bonne consistance.

Au cours de ce travail, l'approche expérimentale adoptée a permis d'avoir quelque résultat qui devrait être complétés par d'autres travaux et nous suggérons :

-La production de la protéase de *Mucor circinelloides* et Graines de citrouille (*cucurbita pepo l*) sur différents résidus agroalimentaires.

-Ainsi qu'une optimisation de la production des protéases.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

AFNOR, 1986 : Association Française de Normalisation, contrôle de produits laitiers Recueil des normes Françaises 3^{ème} Edition.

Alais C ; 1984 : Sciences du lait. Principe des techniques laitières. Ed. Sepaic, Paris, 4^{ème} Ed., 68.

Alais C ,1974 : Sciences du lait. Principe des techniques laitières 3^{ème} édit ; pp162-164. ; 618-619.

Amiot J, Fournier F, Lebeuf Y, Paquin P, Simpson R ; 2002 : composition propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait, Dans : science et technologie du lait : transformation du lait. Presses internationales polytechnique, Montréal 1-73.

Anonyme ,1983 : oidium des cucurbitacées 3^{ème} Edition Paris 19 ; 2 p.

Anonyme ,1997 : Etude des productions maraichères en Algérie les cultures maraichères(1) I.D.C.M.

Ait Abdelouahab N, 2001 : Microbiologie alimentaire. Office des publications universitaires. Alger.

Assamoi A.A, Jacqueline D, et Philippe T, 2008 : aspects microbiologiques de la production des protéases par fermentation solide des endo-b-1,4-Xylanases de moisissure le cas de penicillium canescens.

Aunstrup ,K ,O ; Andersen E ,A ; Falch et T.K Nielsen (1980) : Economics of fermentation process In, microbial Technology fermentation technology Vol 2 peppler HJ and , perlman 'eds) academic Press New York NY ,Etats -Unis .

B

Barabosa M ; Valles E, Vassal C, et Mocquot G, 1976 : l'initiation de l'extrait de cyne cardunculus comme agent (coagulant en fabrication de fromage le lait Vol 1 et 2 p 14-16.

Bengana M ,2001 : Isolement, purification et Caractérisation des enzymes protéolytiques (Pepsine/chymosine) issues des caillettes de bovines adultes incorporation de ces préparations dans la fabrication du fromage à pâte molle tpe camembert à la laiterie de draa ben khada. Thèse Magister, institut national agronomique El- Harrach, alger, 2001.

Berridge N.J.1955 : Purification and assay of rennin . Methode in enzymology volume 2 pp69-77 Ed .Perlmann G.E.and Lorand L.Acad .Press Inc ., New York.

Bellon Maurel V, Orliac O ET Christen P, 2003 : Sensors and measurements in solid – state fermentation a review proséss biochem 38 881-896.

Références bibliographiques

Bergere JL, Lenoir J., 1997 : Les accidents de fromage et les défauts des fromages in Eck A Gillis G C eds le fromage 3^{ème} Edition tec et doc Lavoisier Paris.

Boiron P .1996 : Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan p :13-69
Botton B , **Breton A, Fevre M, Gauthier S, Guy P H , Larpent P J, Reymond P, Sanglier J J, Vayssier Y , V eau P , 1990** : moisissures utiles et nuisibles importance industrielle .2^{ème} édition .Masson collection Biotechnologies p 34-428.

Brule G, Lenoir J, Remruf F, 1997 : le fromage 3^{ème} édit, technique et doc.

G.Brule et J.Lenoir (1981) : la coagulante du lait, dans le fromage, ed, Eck a, diffusion Lavoisier Paris pp1-22.

Boudouma D, 2009 : composition chimique de son de blé dur produit par les moulins industriels algériens livestock research for industriel rural développement 21(10).

Bourgeois et al, 1996 : microbiologie alimentaire tome 2 aliments fermentes en fermentation alimentaire Edition t et don paris .

C

Catherine Foucaud-Scheunemann ,2005 : Mission communication date de création 19 septembre 2005, date de dernière mise à jour : 14 novembre 2007.

Chevalier A, 1997 : Encyclopédie des plantes médicinales, sélection de Headers digestion Montréal camada 1997 .

Cheftel J C ; Chaftel, H ;(1980) ; Introduction à la technologie des aliments.tome 2.Ed. Lavoisier, Tech et Doc. Paris.P54-60.

Corderio M, Jacob E, Puhan Z, et Pais M.S al ,1992 : Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from cynara cardunculus, Milchwissenschaft vot :47 p 684-687 .

Chemlal en 1998 : caractérisation et purification partielle de coagulases de *Bacillus subtilis* S₃ et *Bacillus coagulans* LC 23.2 mémoire ing , Génie biol , INS , USTHB ,Bab Ezouar .

Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripon, J-C., Lambert, G. and Lenoir, J. 1997 : La biochimie de l'affinage. In Le fromage. Eck, A. et Gillis, J.-C. Lavoisier Tec & Doc. Paris. p.86-153.

Références bibliographiques

D

Dalgleish D.G, 1997 : The Enzymatic coagulation of milk, in Advanced Dairy Chemistry V1 Proteins P.F.Fox Blackie and son Ltd p673 619 .

Durand Get Monsan P, 1982 : les enzymes production et utilisation industrielles Ed Gauthier, Villars paris 69-74pp .

Durrieu G, 1993 : Ecologie des champignons Edition Masson, Hauts –de – Seine paris 52-56.

E

ECK A ,1987 : le fromage, 2^{ème} édition tech et doc Lavoisier, paris.

ECK A ,1990 : Le fromage Tec et Doc Lavoisier, Paris.

ECK A , Gillis J 1997 : le fromage de la science a l'assurance qualité . 3^{ème} Ed.

El Mayda E, Paquet J.D, Ramet J.P E et Linden G, 1986 : Proyeolytic Activity of a Bacillus subtilis neutral protease preparation upon caseins and whey proteins of cow's milk dairy sci 69 :305-310 .

EL –Bendery M.A, Moharam M.E et Thanaa H.A ,2007 : purification and characterization of milk clotting enzyme produced by bacillus sphaericus .journal of applied sciences reserch 3(8) : 695-699.

Emilie F, Lavoisier, 2005 : Lavoisier, 2005, (3^{ème} tirage ,2006), ISBN : 2-7430-0810-5.

F

Fernani L ,2002 : obtention et caractérisation d'une protéase coagulant le lait à partir de graines de melon (cucumis melo L) mémoire de magister , génie alimentaire , faculté des sciences de l'ingénieur , boumerdes.

FAO ; 1990 : le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, produit par le département de l'agriculture.

Références bibliographiques

G

Glaude, D, 2001 : lait, nutriment et santé édit / Tech et doc.

Guiraud, 1998 : Microbiologie alimentaire. Ed DUNDO, Paris p62.

Gaurssaud J, 1993 : (réacteurs traditionnels à enzymes libres, cas de l'industrie. in biotechnologie) coord Oscriban R 4^{eme} édit.

H

Hamrani L, 2007 : Etude comparative de deux protéases coaglant le lait extraites proventricule de poulet (*Gallus gallus*) et de l'estomac de limon (*Seriola* sp), mémoire Mag sciences Agronomique, institut national agronomique El-Harrach Alger.

Houins G, Derionne CL coppens R, 1973 : Eude comparative de la coagulante et du pouvoir protéolytique de la présure de trois ses succédanés le lait 3 (529-530) p.

J

Jarmul I, Reps A, Poznaski S, ER Zelazowska H et al et al, 1982 : Utilisation du mélange de le pepsine avec la préparation « fromage » dans la fabrication des fromages EDAM et kortowski le lait 62,75-86.

Joseph-pierre Guiraud, 1998 : Microbiologie alimentaire édition .Dunod, paris.

Jaque Mathieu, 1997 : initiation à la physico-chimie du lait, tech et doc Lavoisier Paris.

K

Kamoun P ; 1997 : appareils et méthodes en biochimie, ed, Flammarion medicine ; paris, 652P.

Kumar S, Sharma N.Sm R, Sharab, et Singb R, 2005 : Extracellular acid protease form rhizopus oryae : purification and characterisation Elsevier proses biochemistry vol 40 p 1701 -1705.

L

La voisier, 2008 : Les produits laitiers 2édition.

Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, and Randall R.J(1951 : protein measurement with the Folin –Phenol reagents, J Biol Chem 193, 265-275.

Références bibliographiques

Lorreta G ,1997 : Les enzymes en agro-alimentaire Tech et doc.

Luquet E.M, 1985 : lait et produit laitiers vache ; brebis ; et chèvres, transformations et technologies : tome 2, Edition techniques et documentation – Lavoisier 445p.

Luquet FM ; 1986 : lait et produit laitiers vache ; brebis ; et chèvres 3^{ème} édition ; Tech et doc, Lavoisier Paris .

Luquet FM ,1990 : lait et produits laitiers vache, brebis chèvre T2 Ed Tech et doc Lavoisier.

Leyral C, Vinrling E 2001 : Microbiologie et toxicologie des aliments Hygiène alimentaire, Ed , Dunod ,Paris .652p .

Leclerc H, Gaillard J.LSimonet M .1995 : Microbiologie générale. la bactérie et le monde bactérien p : 199- 133 3134-194.Edition Doin ,Paris .

Lenoir J., Remeuf, et Schneid N., 1985 : Le lait de fromagerie. In : Eck A. et Gillis J.C. Le fromage de la science à l'assurance- qualité. 3^e ed. Tec. Et Doc. Lavoisier.

Larpent JP Larpent M , 1997 : mémento technique et microbiologie , Edition Tec et Doc , Lavoisier paris 110-122 pp .

Leclerc M et al, 2000 : Microbiologie général , Edition Technique de documentation , Lavoisier paris 156.160pp.

Linden 1987 : les protéases dégradent les proteines avec la fromation de protoses peptones de pp tides et d'acide aminés.

M

Munro, 1969 : General arpects of the régulation of protem metabolism metabolism by diets and by hormons in monnanin protein metabolism vol app 381 -481 ikn munro (edition , neo york academie)

Meitton B Dermazeaud M ,Deroissart H , et Weber F. 1994 : Méthodes in Transformation du lait en fromage .In : bactries lactiques T2 Coord , Deoissart H , et luquet F.mM , Ed .Lorica.

Meitton B De roisart H ,Deesmazeaud B Xebre 1986 : Transformation du lait en fromage .In : bactries lactiques Luduet FM .Edition Lorica tome 2 (55-780)p .

Ma Murado , Ma ig siso Gonzalez D J pintado (1993) : (characterization of microbial biomasses and amylytic preparations obtained from mussel processing wasrte treatment) bioresource technology V 43 (1993) p 117-125 .

Références bibliographiques

Mathieu Jacques ,1998) : Initiation à la physicochimie du lait, technique et documentation Lavoisier Parids pp 12-199.

Mahaut M, Jeant t R, Beulè G , Schuck P, 2000 : les produits industriels laitiers Tac et Doc , Paris , France .

Mahaut., Jeanter. et Brule G. (2003). Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc, Paris, France.

Mathot p ,1996 : Modélisation d'un réacteur simplifié pour la fermentation solide de produits et sous produits agricoles valorisation de l'aliment ferment par le porc thèse de doctorat : faculte universitaire des sciences agronomiques de Gembloux(Belgique) .

Morsli A , Bellal M.M et Ammouche A1981 : Etude du pouvoir coagulant de quelques plantes locales annales de l'I.N.A El-Harrach .

Mouzali A ,1996 : Recherche sur les activités protéasiques de l'extrait de cynara scolymus du latex de ficus carica et de pro-ventricule de Gallus gallusen vue de leur utilisation en technologie fromagère thèse magister I.N.A .El-Harrach .

Mouzali L ,2001 : Extraction enzymatique et caractérisation de l'agent coagulant de la fleur de cardon sauvage (cynara cardunculus L) mémoire de magister sciences alimentaire I.N.A .El-Harrach .

Matoub (2000) : essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produits par la souche locale de *Bacillus subtilis L* (LC₃₃) , thèse magister I.N.A .El-Harrach 91p .

N

Nadhour S, Belloul A, 2003 : Extraction et caractérisation d'un agent coagulant issu des graines de citrouille (cucurbite pepo .P) et son utilisation comme succédané de présure dans la fabrication d'un fromage à pâtes pressée non cuite type « EDAM» 2003(mémoire) .

Nicklin J, Grame –Cook K, Paget T , Killington R(2000) : l'essentiel en microbiologie . Édition Berti p : 210-216.

Negi S et Benerjee R (2009) : characterization of amylase and protease produced by *Aspergillusawamoriin* a single bioreactor .food res int 42-443-448 .

Références bibliographiques

P

Pascal C, Joël C , Françoise GQ , 2004 :Opérations Unitaires en génie biologique (fermentation) biologie et technique .

poznanski S, Reps A et Dawlaszewica ,1975 : Propriétés coagulantes et protéolytiques de la protéase extraite de cersium arvensis le lait Vol : 1 p 669-682

pien, 1974 : Etude de la coagulation du lait par la présure rev tech pp21 29.

Preetha et Boopathy (1997) : purification and characterisation of Milk clotting protéases from rhyzomucor miehei w j microb bio 13.3.573-578.

Patraacissiene Det Lapid 1981 : Qualité bactériologique du lait et produits laitiers analyses et tests Edition tec et doc paris.

R

Ramet J.Pet Hardy J 1973 : les enzymes coagulantes en fromagerie Tech du lait, Vol 4.

Ramet J.P., 1987 : Contribution à l'étude d'influence des facteurs de milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. Le lait 60,1-30.

Ramet J.P, 1990 : Les agents de transformation du lait. In: Fromage. Coord. Eck A. Tech. ET Doc. Lavoisier, Paris: 101 – 105.

Ramet J.P,1997 : Ramet JP scher j propriétés physiques du coagulum LN ECK A Gilis JC eds le fromage 3^{ème} édition.

Reps A ,et Zelazowska , H, 1982 :Some factors affecting the proteolytic activity of a microbial enzyme préparation .J. food biotech .N°5. Vol 71.

Ribadeau , et Dumas B, 1979 : Progés récents dans la biochimie des protéines du lait .Revue laitière française 371 45-59.

Roseiro M D, 1991 : Ewe's milk cheesmaking in Portugal using végétal rénnetOZ Dairy Navs N°8 Vol : 74 -75.

S

Scott R, 1973 : Rennet and rennet substitutes .Process biocg Vol 12 .

Scriban R, 1988 : Biotechnologie 3^{ème} Edition Tech et doc, Lavoisier pp 266 -486 .

Simon, P, Meunier R (1970) : Microbiologie industrielle et génie biochimique .Ed Masson et Cie . Paris.

Snoussi SA, 1981 : les cultures maraicheres en Algériens les cucurbitacées, les crucifères, les Ombellifères Poly .INA El-Harrach, 18,20 p.

Snoussi SA ,1983 : les cultures maraichères générales .Tome I, Poly, INA El-Harrach.

Références bibliographiques

T

Talantikite – Kellil ,s, Nouani , A saunier , M Gillmann ,L. Brahmi ,A and Fazouane 2012 : Isolation and identification of bacterial strain 133 M producing milk –clotting enzyme : Optimization of culture parameters using response surface . African journal of biotechnology Vol .11(100), pp.16594-16606.

Talantikite S ,2015 : thèse de doctorat.

Tsouli J, 1974 : Etude comparée de l'activité de trois variétés d'artichauts du genre cynara scolymus sur la coagulation du lait .le lait.

V

Vierling ; 2003 : aliments et boissons. Filières et produits. Doin éditeurs .Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine .

Veisseyre R, 1975 : Technologie du lait 3^{ème} Edition.

Veisseyre 1979 : Technologie du lait récolte traitement et transformation du lait pays chaud et maison rustique, Paris (France) 696p.

Vierling E, 2004 : aliments et boissons, filtres et produits, science des aliments, Dion édition bordeaux 64-69 pp.

W

Wilkinson. MG ,1993 : Accélération of cheese ripening .In Fox .p.F. ED .Cheese chemistry physics and microbiology .Chapman and Hall .London p 523 -530 .

Annexes

Annexe N°1

Préparation du milieu « PDA » :

- Glucose 20g
- Agar25g
- pomme de terre épluchée et coupée en petits morceaux250g

Préparation :

- Faire bouillir 250g de pomme de terre épluchée et coupée en petits morceaux.
- Essorer et récupérer le jus de pomme de terre.
- Ajouter 20g de glucose et agiter sur un agitateur.
- Vérifier le (pH = 5).
- Ajouter 25g d'Agar et 500ml d'eau distillée (si nécessaire chauffer pour obtenir une dissolution complété).
- Verser la solution dans des flacons 250ml en laissant 2,5 cm du vide.
- Stériliser à 121°C pendant 15 min.
- Laisser refroidir.
- Conserver le milieu à T=4°C.
- Faire couler la gélose PDA dans des boîtes pétrie dans les conditions suivante :
 - * Faire dissoudre le milieu PDA dans un bain marie.
 - * Laisser un peu refroidir devant un bec bunsen.
 - * Faire couler le milieu gélosé dans les boîtes pétries.
 - * Laisser refroidir.
 - * Conserver les boîtes à T=4°C.

Annexe N°2

Préparation de la solution Tampon (pH =6) :

Solution A= phosphate monopotassique 1/16 molaire (par liter, 9,073 g KH_2PO_4)

Solution B= phosphate disodique 1/16 molaire (par liter, 11.87 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

- Formule du Tampon = X ml de A+ (100-X) ml de B

Annexe N°3

➤ Préparation du substrat de Berridge

Le substrat de Berridge est préparé par addition de 12 g de lait écrémé à 100 ml de solution de CaCl_2 à 0,01M. Après 30 mn d'agitation lente, le pH est ajusté à 6,4.

La température du lait est ramenée à 35°C afin de mesurer le temps de coagulation qui correspond à l'apparition des premiers flocons sur la paroi interne du tube dans les conditions de réaction

Annexe N°4

Préparation de la solution Tampon (pH= 5.2 / 0.1 M)

Solution A : acétate sodique 0.1N (par liter , 2,204g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$)

Solution B : acide acétique 0.1 N (6,005 g/l)

X ml de la solution A+ (100-X) ml de solution B représente la solution tampon à pH 5.2

Annexe N°5

Activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée par la méthode MA murado , Ma IG Siso 1993

1- préparer la solution HCL 0.01 N pour dissoudre la tyrosine à raison de 100ug /ml pour HCL il faut 0.39 ml HCL 38% → 500ml d'eau distillée

2- solution mère :

Pour avoir une solution mère qui contient 100ug /ml, on dissout 10 mg de tyrosine dans 100ml d'HCL 0.01N

3 – solution réactive :

*sol A : 2 g NaOH → 500ml d'eau distillée
Na₂CO₃ 10g

NaOH /Na₂CO₃

*sol B : tartrate double de Na et K : 2g → 100ml d'eau distillée.

* sol C : sulfate de cuivre CuSO₄ ·5H₂O :1g → 100ml d'eau distillée.

- Mélanger juste avant l'emploi dans l'ordre la solution réactive :

- sol C : CuSO₄ 0.5 cm³.

- sol B ; 0.5 cm³.

- sol A : 50 cm³.

Prélever 5ml de la solution réactive à mettre dans chaque tube

4- préparer TCA 5% (5g de TCA dans 100 ml d'ED)

5- caséine 1% 1g dans 100ml NaOH 0,02

6- folin dilué au 1/3 ex : 2ml folin + 4ml H₂O

Mesurer la DO à 660 nm

7- NaOH 0,02N

1mol :40 g → 1000ml

4g-----100ml-----1M

X.....100ml-----0.02M

$X=4 \times 0.02 = 0.08$ gr dans 100ml d'eau distillée

N° Tube	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
De tyrosine (ug/ml)											
Solution mère (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Eau distille (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Solution réactive (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Mode opératoire :

- 1) 1ml de solution enzymatique
+ 1mlk de la caséine à 1%
+ 2ml tampon (pH=6)
- 2) Incuber 10minutes à 35°C
- 3) Ajouter 5ml de TCA à5% (12%) pour stopper la réaction
- 4) Laisser reposer 15 mn, filtrer sur papier filtre plissé
- 5) A1ml de filtrat ajouter
 - 5ml de solution réactive
 - incuber 10min à35°C
 - 0.5ml du réactive de folin dilué au 1/3
 - agiter
 - incuber 30min à 35 °C
 - lire la DO

Annexe N°6

Dosage des protéines : (méthode de LOWRY et al, 1951)

Le dosage des protéines dans les solutions enzymatiques est effectué par la méthode de LOWRY (LOWRY et al, 1951)

1/ préparation des solutions réactives :

-solution A : 2g de NaOH dans 500ml d'eau distillée puis ajoute 10g Na_2CO_3 .

- solution B : 2g de tartrate double de sodium et potassium dans 100ml d'eau distillée.

- solution C : 1g de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) dans 100ml d'eau distillée .

En respectant l'addition des réactifs, mélangés : (cette solution doit être préparée juste avant l'emploi et dans l'ordre)

Solution C : 0.5cm^3

Solution B : 0.5cm^3

Solution A : 50cm^3

2/ préparation de la gamme étalon : solution de BSA (sérum de l'albumine)

Solution mère à 200 ug /ml de BSA : peser 10mg les mettre dans une fiole jaugée de 50ml compléter avec H_2O (cela fait 200 ug /ml)

3/ solution diluée de folin à raison 1/3

N° Tube	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration BSA (ug/ml)	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Solution mère (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Eau distille (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Solution réactive (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Faire la courbe d'étalonnage (sol étalon + H_2O , agiter, +sol réactive, agiter, attendre 10 min, ajoute folin, agiter, laisser 30 min à l'obscurité) lire la DO à 660 nm.

Pour l'EEB :

- Diluer (à confirmé)
- prendre 1ml EEB ajouté 5ml de sol réactive
- Agiter
- Attendre 10min
- Ajouter 0.5 ml de folin (dilué 3fois)
- Agiter
- Laisser reposer 30min à l'obscurité
- Lire la DO à660

Annexe N°7

Numération sur la cellule de Malassez :

But :

Effectuer un comptage des cellules présentes dans le milieu de culture.

Principe :

La cellule de Malassez se compose d'une grille subdivisée en 25 petits quadrillages. Chaque quadrillage permet de compter les cellules présentes dans 1/5 du volume recouvrant la cellule qui est de 1 ml.

Mode opératoire :

- On applique sur la lame une lamelle au-dessus des quadrillages visibles par transparence.
- On applique sur les bords supérieurs et inférieurs de la lamelle le liquide numérér (il passe entre lame et lamelle par capillarité) .
- Lame et lamelle sont placées sous le microscope pour le comptage (grossissement $\times 40$).
- On compte les cellules présentes dans les quatre quadrillages constituant les quatre coins de la grille ainsi que dans le quadrillage central.

Détermination du nombre de cellules :

$$\text{Nbre de cellules /ml} = \frac{\text{Nbre de cellules comprises dans 5 quadrillages}}{5} \times 10^5$$

10^5 : facteur multiplicatif pour ramener le nombre de cellules comptées 1 ml de milieu.

Le nombre de cellules comptées par quadrillages ne doit pas excéder 80. Au-delà de ce nombre, on réalise une dilution dont on tiendra compte dans le calcul final.

Annexe N°8

Préparation des solutions tampons

(kamoun ,1977)

1) le tampon Acétate de sodium 1M pH = 5 :

-solution A : Acétate sodique ($C_2H_3O_2Na$) 0,1 N ,8,204g/l

- solution B : Acide acétique (CH_3COOH) 0,1N. 6,005g/l

- solution C : tampon acétate de Na 1M à pH =5 :

On mélange : 67,8ml de A + (100-67,8) ml de B

2) solution salée de NaCl à 0,9 % :

0,9g de NaCl dilué 100ml d'eau distillée

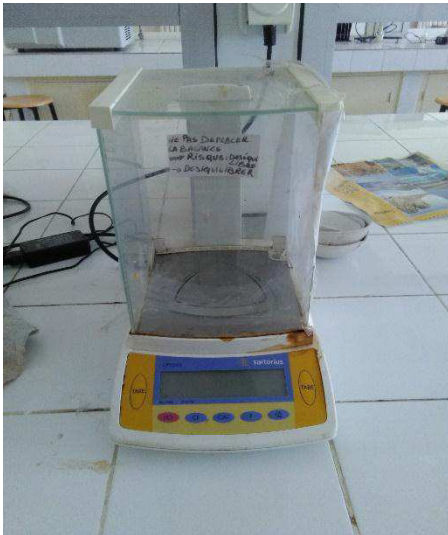
Annexe N°9



Autoclave



Bain marie



Balance analytique



Etuve



Vortex



Plaque chauffante



Centrifugeuse



pH -mètre



Dessiccateur



Centrifugeuse Gerber



Incubateur



Eprouvette

Résumé

Résume

L'objectif de notre travail est l'extraction et la caractérisation des enzymes de *Mucor circinelloides* et de Graine de citrouille (*cucurbita pepo L*) et l'étude de la possibilité de leur emploi en industrie fromagère comme succédané de présuré. la protéase coagulante des souche est obtenue par une fermentation sur milieu solide à base de son de blé et de l'extraction du système enzymatique brut de graine de citrouille (*cucurbita pepo L*) matière premier disponible l'extraction est réalisée en solution NaCl 0.9%

Après l'extraction de ces protéase, une caractérisation des EEB est effectuée en étudiant les différents facteurs qui ont une influence sur l'activité coagulante. il ressort que son optimum à 65°C avec un pH = 6 et une concentration 0.04M de CaCl₂ pour *Mucor circinelloides* et 80°C avec un pH = 6.4 et une concentration 0.05M de CaCl₂ pour Graines de citrouille.

Mot clés : *Mucor circinelloides* – La Graine de citrouille (*cucurbita pepo L*) – EEB- succédané – extraction – fermentation – caractérisation - fromage

Abstract

The objective of our work is the extraction and characterization of the enzymes of *Mucor circinelloides* and Pumpkin seeds (*cucurbita pepo L*) and the study of the possibility of their use in the cheese industry as a rennet substitute. the coagulant protease of the strain is obtained by a fermentation on a solid medium based on wheat bran and the extraction of the crude enzymatic system of pumpkin seed (*cucurbita pepo L*) raw material available extraction is carried out in NaCl 0.9%

After the extraction of these proteases, a characterization of the EEBs is carried out by studying the various factors which have an influence on the coagulating activity. it appears that its optimum at 65 ° C with a pH = 6 and a 0.04M concentration of CaCl₂ for *Mucor circinelloides* and 80 ° C with a pH = 6.4 and a 0.05M concentration of CaCl₂ for pumpkin seeds.

Key words: *Mucor circinelloides* -Pumpkin seed (*cucurbita pepo L*) - EEB- substitute - extraction - fermentation - characterization - cheese

ملخص

ودراسة (L بببو cucurbita) العفنة وبذور اليقطين circinelloides والهدف من عملنا هو استخراج وتوصيف الأنزيمات إمكانية استعمالها في صناعة الجبن كبديل عن المنفحة. يتم الحصول على البروتيني تجلط الدم من سلالة من قبل التخمر في وسط مادة الأولى متاح استخراج (L بببو cucurbita) صلب بناء على نخالة القمح واستخراج نظام الخام الانزيم من بذور اليقطين ونفذت في كلوريد الصوديوم 0.9% الستالايت و حلول

من خلال دراسة العوامل المختلفة التي لها تأثير على نشاط التخثر. يبدو أن EEBs بعد استخراج هذه البروتيناز، يتم توصيف العفنة و 80 درجة circinelloides إلى CaCl₂ من الأمثل لها عند 65 درجة مئوية مع درجة الحموضة = 6 والتركيز 0.04 للبدور القرع CaCl₂ M مئوية مع درجة الحموضة = 6.4 وتركيز 0.05

الكلمات المفتاحية

البديل - الاستخلاص - التخمر - التوصيف - EEB- – (cucurbita pepo L) بذور اليوميين - *Mucor circinelloides* الجبن