

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

المدسة الوطنية العليا للفلاحة – الحراش الجزائر

Ecole Nationale Supérieure Agronomique - El Harrach –Alger

Département : Technologie alimentaire et nutrition humaine

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de doctorat en sciences agronomiques

Thème

*Etudes des propriétés biochimiques, sensorielles et rhéologiques des fromages fabriqués à base de présure de remplacement d'origine végétale (*Cynara scolymus*) et microbienne (*Bacillus velezensis* FK6A, *Mucor circinelloides* SF15).*

Présenté par : Mme BOUMEDIENE Farida

Soutenue publiquement ledevant le jury:

Nom et prénom	Grade	Statut	Etablissement
BELLAL Mohand Mouloud	Professeur	Président	ENSA
MEKIMENE Lakhdar	Professeur	Examinateur	ENSA
YAHIAOUI Karima	MCA	Examinatrice	UMBB
BENAKMOUM Amar	MCA	Examinateur	UMBB
NOUANI Abdelouahab	Professeur	Directeur de thèse	UMBB
TRIKI Sadek	Professeur	Co Directeur de thèse	ENSA

Année universitaire 2020-2021

Remerciements

*Il me sera difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme. J'adresse mes vifs remerciements et ma profonde reconnaissance en particulier à Mlles **SADI Katia**, **BENAROUS Rima**, **HADDAD Siham**, **TOUHRIA Lydia**, **BOUIZRI Farida** et **Mme TALANTIKITE Souad** qui ont apporté leur contribution à la réalisation de ce travail.*

*Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse, le Professeur **NOUANI Abdelouahab**, pour toute son aide, il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. Je vous remercie pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail. J'ai eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, et ai trouvé auprès de vous le conseiller et le guide qui m'a reçu en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance. Votre compétence professionnelle incontestable ainsi que vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous. Vous êtes et vous serez pour nous l'exemple de rigueur et de droiture dans l'exercice de la profession.*

J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.

*A mon Co directeur de thèse, le Professeur **TRIKI Sadek** pour avoir accepté de co-diriger ce travail.*

*Je tiens à remercier particulièrement Monsieur **BELLAL Mohand Mouloud** professeur à l'ENSA, qui m'a fait l'honneur de présider le jury.*

*Mes remerciements vont également au professeur **MEKIMENE Lakhdar** et aux maîtres de conférences A, **BENAKMOUM Amar** et **YAHIAOUI Karima** qui ont accepté de juger ce travail.*

Je dois également un mot de remerciement à :

*Monsieur **BELBRAOUE Slimane** professeur à l'Université de Moncton (Canada) pour ses précieuses aides.*

*Monsieur **DAKO Etienne** professeur à l'Université de Moncton (Canada) pour m'avoir aidé à réaliser certains essais au niveau de son laboratoire respectif.*

Mes remerciements vont également au personnel du département de Technologie alimentaire de l'ENSA et de l'université de Boumerdès pour leur aimable collaboration.

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, L'amour, le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que Je dédie cette thèse ...

A la mémoire de mon père

J'aurais tant aimé que tu sois présent. Que Dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde

A ma chère maman

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu as consenti pour mon instruction et mon bien être.

A mes chers beaux parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur.

Une spéciale dédicace a cette personne qui compte déjà énormément pour moi, et pour qui je porte beaucoup de tendresse et de respect.

A toi cher époux Mourad

A Mon adorable petit prince

ANIS

A mes chers et adorables frère et sœurs

Abdelmalek ; Nawel ; Meriem ; Kenza et Kaouther

À mes chers petits neveux et nièces

Ritedj, Adam, Aridge, Lina, Abir, Ahmed, Zina et Dina

A mes Chers beaux frères

Riadh, Fathi, Lotfi, Youcef, Hicham et Ismail.

À mes amis de toujours

À toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail à tous ceux que j'ai omis de citer.

Résumé

Les travaux de la présente thèse est un prolongement des nombreux essais réalisés auparavant sur les succédanés de la présure traditionnelle et une contribution à l'échelle universelle à l'étude des différentes présures de remplacement d'origine animale, végétale et microbienne et leurs aptitudes technologiques en vue d'une application industrielle dans le but d'élaborer des diagrammes technologiques innovants afin d'élargir la gamme de fromages existants. Par ailleurs, l'emploi des sources naturelles issues de l'alimentation Bio, en pleine expansion dans le monde et l'intérêt que portent les populations à des molécules isolées de la biodiversité constitue en soi l'intérêt du travail de l'impétrante.

La thèse évoque les essais expérimentaux menés sur les présures de remplacement qui sont issues de la biodiversité végétale et microbienne (cardon, moisissure et bactérie) par un isolement et une identification de souches locales. Les travaux enregistrés au niveau du laboratoire vont permettre vraisemblablement à élaborer une fiche technique nationale de l'ensemble des succédanés dont les résultats seront orientés vers des applications en fromagerie.

Dans un premier temps, l'expérimentation a été conduite sur des sous-produits valorisables qui peuvent avoir une forte valeur ajoutée par l'élaboration des fromages à pâte pressée à base d'enzymes issues des fleurs séchées de *Cynara scolymus* (artichaut). Des propriétés biochimiques, rhéologiques et sensorielles ont été évaluées.

Dans un deuxième temps, un isolement et une identification par la biologie moléculaire a été réalisée sur des souches bactérienne et fongique dont la séquence génomique a été enregistrée au niveau de la base NCBI avec des codes respectifs de **MH368142** et **MH368140**. Il s'agit respectivement de *Bacillus velezensis* et de *Mucor circinelloides*. Les propriétés biochimiques ont été mis en évidence sur les fromages fabriqués.

L'ensemble des résultats auxquels a abouti cette étude montrent que les protéases étudiées présentent des potentialités coagulantes non négligeables et ouvrent de nouvelles pistes de recherche complémentaires pour développer la production des enzymes microbiennes. Cependant, une remarque s'impose dans ce résumé. La particularité de la protéase de *B.velezensis* repose sur ses effets très protéolytiques ce qui a conduit à orienter le protocole vers la fabrication d'un fromage à pâte cuite dans le but d'inhiber l'activité de l'enzyme durant les différentes étapes du diagramme après la formation du coagulum.

Mots clés : *Cynara scolymus* , *Mucor circinelloides* , *Bacillus velezensis*, protéase, fromage, propriétés biochimiques, propriétés rhéologiques, propriétés sensorielles.

Abstract

The work of this thesis is an extension of the many tests previously carried out on substitutes for traditional rennet and a contribution on a universal scale to the study of different replacement rennet of animal, plant and microbial origin and their technological aptitudes. with a view to an industrial application with the aim of developing innovative technological diagrams in order to expand the range of existing cheeses. In addition, the use of natural sources from organic food, which is expanding rapidly around the world, and the interest that populations have in molecules isolated from biodiversity, in itself constitutes the interest of the work of the applicant.

The thesis evokes the experimental tests carried out on replacement rennet which are derived from plant and microbial biodiversity (cardoon, mold and bacteria) by isolation and identification of local strains. The work recorded at the laboratory level will probably make it possible to prepare a national technical sheet of all the substitutes, the results of which will be oriented towards applications in cheese making.

Initially, the experiment was conducted on valuable by-products which can have a high added value by the development of hard cheeses based on enzymes derived from dried flowers of *Cynara scolymus* (artichoke). Biochemical, rheological and sensory properties have been evaluated.

In a second step, isolation and identification by molecular biology was performed on bacterial and fungal strains (whose genomic sequence has been registered at the NCBI database with respective codes **MH368142** and **MH368140**. These are *Bacillus velezensis* and *Mucor circinelloides*, respectively. The biochemical properties have been demonstrated on the cheeses produced. All the results produced by this study show that the proteases studied have a significant coagulant potential and open up new avenues of complementary research to develop the production of microbial enzymes. However, one remark stands out in this summary. The particularity of the protease of *B.velezensis* is based on its very proteolytic effects which led to orient the protocol towards the manufacture of a baked cheese with the aim of inhibiting the activity of the enzyme during the different stages of the diagram after the formation of the coagulum.

Keywords: *Cynara scolymus*, *Mucor circinelloides*, *Bacillus velezensis*, biochemical properties, rheological properties, sensory properties.

ملخص

يعد عمل هذه الأطروحة امتداداً للعديد من الاختبارات التي تم إجراؤها سابقاً على بدائل المنفعة التقليدية ومساهمة على نطاق عالمي في دراسة مختلف بدائل المنفعة ذات الأصل الحيواني والنباتي والميكروبي وقابليتها التكنولوجية بهدف التطبيق الصناعي لتطوير المخططات التكنولوجية المبتكرة من أجل توسيع نطاق الأجبان الموجودة. بالإضافة إلى ذلك ، فإن استخدام المصادر الطبيعية المشتقة من الغذاء العضوي ، والذي يتوسع بسرعة في جميع أنحاء العالم واهتمام السكان بالجزينات المعزولة عن التنوع البيولوجي يشكل في حد ذاته منفعة للمستخدم.

تناقش الأطروحة الاختبارات التجريبية التي أجريت على المنفعة البديلة المشتقة من التنوع البيولوجي النباتي والميكروبي (الخرشوف ، الفطريات الخيطية والبكتيريا) عن طريق عزل وتحديد السلالات المحلية وبذلك فمن المحتمل أن يتيح العمل المسجل على مستوى المختبر إمكانية تطوير بطاقة تقنية وطنية لجميع البدائل ، والتي سيتم توجيه نتائجها نحو التطبيقات في صناعة الجبن.

في البداية ، تم إجراء التجربة على المنتجات الثانوية القابلة للاسترداد والتي يمكن أن يكون لها قيمة مضافة عالية من خلال تطوير أجبان صلبة تعتمد على إنزيمات من أزهار *Cynara scolymus* (الخرشوف). تم تقييم الخصائص البيوكيميائية والريولوجية والحسية.

في الخطوة الثانية ، تم إجراء عزل وتعريف على السلالات البكتيرية والفطرية بواسطة البيولوجيا الجزيئية (التي تم تسجيل تسلسلها الجيني على مستوى قاعدة NCBI برمز كل منها MH368142 و MH368140 و المتمثلة في *Bacillus velezensis* و *Mucor circinelloides* على التوالي حيث تم توضيح خصائصهم البيوكيميائية في الجبن المنتج.

تظهر جميع النتائج التي توصلت إليها هذه الدراسة أن بدائل المنفعة المدروسة لها إمكانات تخثر كبيرة كما تفتح طرقاً جديدة للبحث التكميلي لتطوير إنتاج الإنزيمات الميكروبية. ومع ذلك ، تبرز ملاحظة واحدة في هذا الملخص تعتمد خصوصية إنزيم البروتياز البكتيرية *B.velezensis* في شدة تحليله للبروتين والتي أدت إلى توجيه البروتوكول نحو تصنيع الجبن المطبوخ بهدف تثبيط نشاط الإنزيم خلال المراحل المختلفة من تشكل

المفاتيح: *Bacillus velezensis*, *Mucor circinelloides*, *Cynara scolymus* ، الخصائص البيوكيميائية ، الخصائص الريولوجية، الخصائص الحسية.

Liste des abréviations

<p>D: Dalton.</p> <p>DO : densité optique.</p> <p>EC : Enzyme Commission number.</p> <p>EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique.</p> <p>EEB : Extrait enzymatique brut.</p> <p>EST : Extrait sec total.</p> <p>J.O : Journal officiel.</p> <p>kDa : kilodalton.</p> <p>KJ.mol⁻¹ : kilojoule par mole.</p> <p>LFB : Laiterie Fromagerie Boudouaou.</p> <p>Log PM : Logarithme du Poids Moléculaire</p> <p>M : Mole.</p> <p>MCA : Milk clotting activity.</p> <p>mM : milli molarité.</p> <p>MS : Matière Sèche.</p> <p>mV : Millivolt.</p> <p>m : masse</p> <p>nm : Nanomètre.</p> <p>N : Normalité.</p> <p>Ncm : Newton centimètre.</p>	<p>Pa : Pascal</p> <p>PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis</p> <p>PCA : Plate Count Agar.</p> <p>PCR : Polymerase Chain Reaction</p> <p>PDA : Potato Dextrose Agar.</p> <p>PM : Poids moléculaire.</p> <p>PVP : Polyvinylpyrrolidone</p> <p>p : poids</p> <p>R² : Coefficient de corrélation.</p> <p>rad : Radian</p> <p>s : seconde.</p> <p>S.D.S : Sodium dodecyl sulphate</p> <p>trs : tours</p> <p>U/g : unité par gramme.</p> <p>U / mg : Unité par milligramme.</p> <p>U / mL : Unité par millilitre.</p> <p>U.A.C : Unité d'activité coagulante.</p> <p>UHT : Ultra haute température.</p> <p>UP : Unité de Présure</p> <p>US : Unité soxhlet.</p> <p>UV : Ultra -violet</p>
---	--

Tables des illustrations

Liste des tableaux

		Page
Tableau n°1	Spécificité rapportée des enzymes de coagulation du lait d'origine végétale sur la κ -caséine bovine.....	11
Tableau n°2	Modélisation des propriétés rhéologiques de quelques types de fromages	27
Tableau n°3	Caractères apparents de l'extrait enzymatique brut.....	56
Tableau n°4	Teneur en protéines totales ou azote kjeldahl (exprimé en %).....	58
Tableau n°5	Rendement d'extraction des protéines totales.....	58
Tableau n°6	Activité coagulante de l'extrait enzymatique brut des fleurs d'artichaut....	59
Tableau n°7	Comparaison de l'AC de l'EEB aux autre AC des coagulases d'origine végétale.	60
Tableau n°8	Valeurs du rapport AC/AP des enzymes coagulant le lait de quelques plantes.....	61
Tableau n°9	Effet des inhibiteurs sur l'activité de l'extrait enzymatique brut des fleurs d'artichaut.....	62
Tableau n°10	Détermination du poids moléculaire de la fraction active (cynarase).....	64
Tableau n°11	Comparaison du poids moléculaire de l'extrait enzymatique de l'artichaut aux autres poids moléculaires des coagulases à cystéine d'origine végétale.....	66
Tableau n°12	Résultats des Analyses physico-chimiques du lait de vache collecté.....	70
Tableau n°13	Potentiel zêta des échantillons de Cynarase et présure après emprésurage.....	76
Tableau n°14	Tableau récapitulatif du test de dégustation (10 panelistes).....	76
Tableau n°15	Caractères physico-chimiques du fromage fabriqué avec la cynarase et la présure commerciale.....	79
Tableau n°16	Evolution des teneurs de l'azote total (Nt), l'azote soluble (Ns) et de l'azote non protéique (Nnp) durant l'affinage.....	83
Tableau n°17	Préparation des solutions coagulantes.....	98
Tableau n°18	Mélange d'ingrédients pour la préparation du fromage fondu pour tartine.....	102
Tableau n°19	Caractères apparents des extraits enzymatiques issus de la fermentation de <i>Mucor SF15</i>	107
Tableau n°20	Résultat de l'activité coagulante de l'extrait dialysé, prépurifié et de la présure commerciale.....	109

Tableau n°21	Indices AC/AP de quelques enzymes comparés à celui de <i>Mucor SF15</i>	111
Tableau n°22	Activité coagulante et force de coagulation exprimée en pourcentage de coupage.....	111
Tableau n°23	Activités coagulantes comparées des coupages des extraits de présure commerciale et de <i>Mucor SF 15</i> (valeur théorique et expérimentale).....	112
Tableau n°24	Résultats des analyses physicochimiques du lait cru avant pasteurisation...	112
Tableau n°25	Résultats des analyses physicochimiques de la pâte à fromage.....	113
Tableau n°26	Résultats de l'analyse de la variance (ANOVA à un facteur) du rendement fromager en fonction du coupage.....	114
Tableau n°27	Résultats des analyses physicochimiques du fromage fondu à tartiner.....	115
Tableau n°28	Conditions optimales de fermentation de la souche <i>Bacillus velezensis</i>	136
Tableau n°29	Comparaison de l'AC de l'EEB aux autre AC des coagulases du genre <i>Bacillus</i> et de la présure bovine.....	136
Tableau n°30	Activité protéolytique, rapport AC/AP et teneur en protéine de l'EEB....	137
Tableau n°31	Effet des inhibiteurs sur l'activité coagulante de l'EEB.....	143
Tableau n°32	Saisie des données statistiques sur le logiciel SPSS.....	145
Tableau n°33	Conditions d'utilisation de la régression linéaire multiple.....	146
Tableau n°34	Evaluation des paramètres du modèle.....	147
Tableau n°35	Précipitation de l'extrait enzymatique brut au sulfate d'ammonium.....	148
Tableau n°36	Paramètres de purification de l'extrait coagulant de <i>Bacillus velezensis</i> FK6A.....	150
Tableau n°37	Estimation du poids moléculaire de la fraction active de <i>Bacillus velezensis</i> FK6A.....	151
Tableau n°38	poids moléculaire de quelques protéases du genre <i>Bacillus</i>	152
Tableau n°39	Composition physico-chimique du lait utilisé dans la fabrication fromagère.....	152
Tableau n°40	Composition physicochimiques globale des fromages obtenus avant affinage.....	153
Tableau n°41	Tableau récapitulatif des résultats de test de dégustations obtenus sur les fromages élaborés.....	154

Liste des figures

Page

Figure n°1	Application de contraintes (force, F , par unité de surface, A) sur un matériau solide (a, b) ou liquide (c).....	19
Figure n°2	Relations entre contrainte, σ et déformation, ϵ , pour un solide élastique (a) et entre contrainte de cisaillement, τ , et vitesse de déformation, $\dot{\gamma}_s$, pour un liquide idéal (b).....	20
Figure n°3	Mesures rhéologiques à grande déformation de laits gélifiés avec addition de la protéase de tamarilline.....	22
Figure n°4	Test de compression uniaxial.....	22
Figure n°5	Schéma du système expérimental pour étudier le comportement rhéologique par compression du fromage.....	23
Figure n°6	Variation de la fermeté et du stress de fracture en fonction de la teneur en protéines dans les fromages Cheddar comprimés à 25% de la taille initiale	24
Figure n°7	Changement de la déformation à la rupture, l'écoulement (lors de chauffage) et la fermeté du fromage type Cheddar avec différente concentration en sel pendant la période d'affinage	26
Figure n°8	Coupe schématique d'un capitule.....	37
Figure n°9	Etapes d'obtention de l'extrait enzymatique brut (<i>cynara scolymus</i>).....	39
Figure n°10	Dispositif de chromatographie d'exclusion moléculaire.....	43
Figure n°11	Diagramme de la fabrication d'un fromage à pâte pressée non cuite à l'échelle expérimentale.....	50
Figure n°12	Photo du viscosimètre « Thermo HAAKE VT550 » et du dispositif de mesure sur géométrie plan plan (photo originale unité matériaux FT,UMBB).....	51
Figure n°13	Schéma de la géométrie plan plan du dispositif de mesure de la rhéologie (viscosité et contrainte) des échantillons de fromage a différentes phases de préparation.....	52
Figure n°14	Appareil de mesure du potentiel zêta (type Zetamètre 2000) des échantillons de laits emprésurés.....	53
Figure n°15	Extraits bruts purifiés et décolorés, non décolorés et effet du stockage de la matière première (fleurs séchées) sur le brunissement enzymatique.....	57

Figure n°16	Profil chromatographique de l'extrait enzymatique brut de <i>Cynara scolymus</i> sur Sephacryl S-200. Débit:0,2ml/mn. Fraction : 2 ml/fraction. Colonne : 80cm×1,5cm.....	63
Figure n°17	profil chromatographique de l'extrait enzymatique brut de <i>Cynara Scolymus</i> sur Colonne semi preparative sur gel Sephadex G-50 (Débit 0,6ml /mn.Fraction : 2,5ml/Fraction).....	63
Figure n°18	Profil électrophorétique de la fraction active issue d'une chromatographie sur Sephadex G-50 de l'extrait purifié de <i>Cynara scolymus</i>	65
Figure n°19	Influence de la température sur l'activité coagulante relative de la Cynarase et la Chymosine d' <i>Aspergillus niger</i>	66
Figure n°20	Influence du pH du lait sur l'activité coagulante relative de la Cynarase et la Chymosine d' <i>Aspergillus niger</i>	67
Figure n°21	Influence de la concentration en CaCl ₂ du lait sur l'activité coagulante relative de la Cynarase et la Chymosine d' <i>Aspergillus niger</i>	68
Figure n°22	Influence de la masse d'extrait enzymatique coagulant de Cynarase et la Chymosine d' <i>Aspergillus niger</i> sur l'activité coagulante relative.....	69
Figure n°23	Viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement d'un échantillon de fromage à pâte pressée à différentes phases de préparation (A : Echantillon à base d'extraits d'artichaut ; B : Echantillon à base de présure.).....	74
Figure n°24	Contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement d'un échantillon de fromage à pâte pressée a différentes phases de préparation (C : Echantillon à base d'extraits d'artichaut ; D : Echantillon à base de présure.).....	75
Figure n°25	Histogrammes d'analyse statistique des paramètres sensoriels (Aspect visuel, arôme et olfaction, Goût et saveurs, Texture) des fromages au seuil de probabilité de 5%.....	78
Figure n°26	Fluctuations de la température et l'humidité relative durant l'affinage.....	78
Figure n°27	Variation de pH des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.....	80
Figure n°28	Variation de l'extrait sec total des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.....	80

Figure n°29	Variation de la matière grasse des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.....	81
Figure n°30	Variation de la teneur en chlorure (NaCl) des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.....	82
Figure n°31	Variation de la teneur en azote total (Nt) des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.....	83
Figure n°32	Variation de la teneur en azote soluble (Ns) des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.....	84
Figure n°33	Variation de la teneur en azote non protéique (Nnp) des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.....	85
Figure n°34	Etapes d'obtention de l'extrait enzymatique brut de <i>Mucor SF 15</i>	96
Figure n°35	Diagramme de fabrication de pâte à fromage à l'échelle de laboratoire.....	100
Figure n°36	Diagramme de fabrication de fromage fondu au niveau du laboratoire.....	102
Figure n°37	Photo du viscosimètre « Thermo HAAKE VT550 » et du dispositif de mesure sur géométrie cône plan.....	103
Figure n°38	Schéma de La géométrie cône plan du dispositif de mesure de la rhéologie (viscosité et contrainte) des échantillons de fromage fondu pour tartine.....	104
Figure n°39	Séquençage de la souche SF15.....	105
Figure n°40	Arbre phylogénétique dérivé de l'analyse de la séquence d'ADNr 18S de la souche SF15 et des séquences apparentées. Barre d'échelle 0,001 substitutions par position nucléotidique. Le numéro d'accession de GenBank pour chaque souche suit le nom de l'espèce.....	105
Figure n°41	Extrait enzymatique brut de <i>Mucor SF15</i>	108
Figure n°42	Aspect comparé des extraits enzymatiques de <i>Mucor SF15</i>	108
Figure n°43	Coagulum obtenu avec l'extrait de <i>Mucor SF15</i> (A) et de la présure commerciale (B).....	110
Figure n°44	Rendements fromagers des différents échantillons de la pâte à fromage....	114
Figure n°45	Photo de pâte à fromage pour les différents coupages.....	115
Figure n°46	photos représentent le fromage fondu à tartiner du différent coupage (A : 50%P/50%EP ; B : 60%P/40%EP ; C : 100% EP ; D : 100% EP).....	116

Figure n°47	Viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement d'un échantillon de fromage fondu pour tartine.....	118
Figure n°48	Contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement d'un échantillon de fromage fondu pour tartine.....	119
Figure n°49	Protocole d'obtention de l'extrait enzymatique brut produit par la souche <i>Bacillus velezensis</i>	126
Figure n°50	Dispositif expérimental de gel filtration.....	129
Figure n°51	Droite de régression du logarithme des protéines marqueurs en fonction de leur volume d'élution par passage sur colonne séphadexG-751 : BSA, 1; Bovin sérum albumine (67 KDa), 2:Ovalbumine (40KDa), 3: anhydrase Carbonique (30kDa) ,4: trypsine (23.8 KDa).....	130
Figure n°52	Etapes de fabrication du fromage à pâte cuite pressée.....	132
Figure n°53	séquençage de la souche FK6A.....	135
Figure n°54	arbre phylogénétique de la souche FK6A.....	135
Figure n°55	Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de l'EEB.....	138
Figure n°56	Effet du pH sur l'activité coagulante de l'EEB.....	139
Figure n°57	Effet de la concentration en CaCl ₂ du lait sur l'activité coagulante.....	140
Figure n°58	Influence de la concentration en extrait coagulant sur l'activité coagulante.....	141
Figure n°59	Stabilité thermique de l'extrait enzymatique brut après 30 min d'incubation.....	142
Figure n°60	Stabilité de l'extrait enzymatique brut au cours de la conservation.....	142
Figure n°61	Profil d'élution sur Séphadex G-75 de l'extrait enzymatique brut de <i>Bacillus velezensis</i> FK6A. (Colonne 1,5 × 30 cm, Tampon d'élution Acétate (0,01 M, pH 5,5), débit : 36 ml/h, fraction de 2,2 ml).....	149
Figure n°62	Poids moléculaire de la fraction active de <i>Bacillus velezensis</i> obtenu à partir du profil de gel filtration sur Séphadex D-75(A). 1 : BSA, 1; Bovin sérum albumine (67 KDa), 2:Ovalbumine (40kDa), 3: anhydrase Carbonique (30kDa) , 4:trypsine (23.8k Da) (B).....	151
Figure n°63	Aspect final des trois fromages élaborés par les différents extraits coagulants.....	154

Figure n°64	Histogramme des résultats des analyses du goût des fromages fabriqués. La différence observée est non significative dans l'intervalle 14-22 (zone entre les traits pleins).....	155
Figure n°65	Histogramme des résultats des analyses de la couleur des fromages fabriqués.....	155
Figure n°66	Histogramme des résultats des analyses de la texture des fromages fabriqués.....	155

SOMMAIRE

	<i>Pages</i>
<i>Introduction générale</i>	1

PARTIE I : synthèse bibliographique

I- Présure et succédanés	04
<i>Introduction</i>	04
1. Présure	04
2. Succédanés de présure	05
2.1.Enzyme coagulante d'origine végétale	05
2.2.Enzyme coagulante d'origine microbienne.....	08
2.2.1. Enzymes d'origine fongique.....	08
2.2.2. Enzymes d'origine bactérienne.....	09
3. Mécanisme d'action sur la caséine.....	10
II- Fromage	12
1. Fromages à base de coagulase d'origine végétale.....	12
2. Fromages à base de coagulase d'origine microbienne.....	14
III- Affinage du fromage	14
IV- Propriétés Rhéologiques du fromage	17
1. Quelques définitions fondamentales.....	17
2. Méthodologies de mesure de la rhéologie du fromage.....	20
3. Facteurs influant sur la rhéologie du fromage.....	23

PARTIE II : Partie expérimentale

Chapitre I : Evaluation des propriétés rhéologiques et sensorielles d'un fromage à pâte pressée non cuite fabriqué à base d'une présure de remplacement d'origine végétale (Cynara Scolymus).

Introduction	37
Matériel et méthodes	37
I- Matériel végétal	37

1. Matière première employée.....	37
2. Obtention et prétraitement des fleurs d'artichaut.....	37
2.1.Extraction de l'enzyme brut.....	38
2.2.Détermination de l'azote totale de l'EEB.....	40
2.3.Rendement d'extraction.....	40
II- Analyse de l'extrait enzymatique brut	40
1. Mesure de l'activité coagulante.....	40
2. Mesure de l'activité protéolytique.....	41
3. Détermination de l'indice AC/AP.....	41
4. Etude des effecteurs.....	41
III- Purification des extraits enzymatiques par chromatographie d'exclusion moléculaire	42
1. Purification sur colonne analytique Sephacryl S-200.....	42
2. Purification sur colonne semi préparatoire sur gel Séphadex G-50.....	42
3. Analyse des extrais purifiés : Méthodes analytiques.....	43
3.1.Détermination du taux de protéines enzymatiques (Méthode de Lowry).....	43
3.2.Mesure de l'activité coagulante.....	43
3.3.Rendement enzymatique.....	43
4. Electrophorèse SDS PAGE et détermination du poids moléculaire.....	44
5. Caractérisation des extraits coagulants purifiés.....	44
IV-Essai de fabrication de fromage à pâte pressée non cuite	46
1. Qualité du lait de vache : Indices physicochimiques.....	46
2. Obtention et dosage des Caséines entières.....	47
3. Préparation du fromage.....	47
3.1. Procédé de fabrication.....	47
4. Rhéologie du fromage.....	50
4.1. Viscosité et contrainte.....	50
5. Mesure du potentiel Zeta des laits emprésurés.....	52
5.1. Mesure du potentiel.....	52
V- Analyse sensorielle : test de dégustation des fromages	53
1. Conduite du test de dégustation.....	53
1.1.Méthodologie de la dégustation.....	53
Résultats et discussion	54

I-	Caractérisation de l'extrait enzymatique obtenu	54
1.	Matière première et extraction.....	54
1.1.	Propriétés de la matière.....	54
1.2.	Morphologie et propriétés physiques des foins (capitule séché).....	54
1.3.	Avantage et inconvénients de la matière première.....	55
2.	Caractères apparents de l'extrait enzymatique brut.....	55
2.1.	Choix du tampon d'extraction du système enzymatique.....	55
2.2.	Caractéristiques de l'extrait brut.....	55
2.3.	Rendement des extraits/matière première.....	56
3.	Propriétés biochimiques de l'extrait enzymatique brut.....	57
3.1.	Concentration en protéines totales et rendement d'extraction.....	57
3.2.	Activités enzymatiques.....	59
3.3.	Détermination du rapport AC/AP.....	61
3.4.	Action des effecteurs sur l'activité coagulante.....	61
4.	Résultat de la Purification d'exclusion sur colonne analytique Sephacryl S-200....	62
4.1.	Propriétés biochimiques de l'extrait enzymatique purifié.....	63
4.2.	Rendement en enzyme purifiée.....	64
4.3.	Identification des cynarases par la SDS-PAGE.....	64
4.4.	Résultat de l'influence de quelques paramètres sur l'activité de l'extrait coagulant purifié de l'artichaut et <i>d'Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	66
II-	Propriétés rhéologiques et sensorielles du fromage à pâte pressée non cuite	70
1.	Propriétés rhéologiques.....	70
1.1.	Qualité du lait de vache.....	70
1.1.1.	Composition physicochimique.....	70
1.1.2.	CPG de la matière grasse.....	71
1.2.	Préparation et rhéologie du fromage.....	71
1.2.1.	Rendement fromager.....	71
1.2.2.	Viscosité et contrainte durant les différentes phases du process : liquide emprésuré, gel présure et fromage affiné et effet des extraits et de la présure commerciale.....	72
1.2.3.	Effet comparé de l'emprésurage des laits par l'extrait enzymatique et la présure commerciale sur le potentiel zêta.....	75

2. Propriétés sensorielles des fromages.....	76
2.1.Résultat du test de dégustation.....	76
III- Evolution des propriétés physicochimiques des fromages à pate pressée non cuite au cours de la période d'affinage.....	78
1. Variation de la température et l'humidité durant l'affinage.....	78
2. Evolution des caractères physico-chimiques du fromage au cours de l'affinage	79
2.1.Variation du pH.....	79
2.2.Variation de l'extrait sec total	80
2.3.Variation de la matière grasse.....	81
2.4.Variation des teneurs en chlorure (NaCl).....	82
2.5.Variation de l'azote total (Nt), l'azote soluble (Ns) et de l'azote non protéique (NNP) au cours de l'affinage	82
Conclusion.....	86
Références bibliographiques.....	87

Chapitre II : Purification et caractérisation d'une protéase d'origine microbienne (*Mucor circillinoides* SF15) et évaluation des propriétés rhéologiques d'un fromage fondu.

Introduction.....	94
Matériel et méthodes.....	94
I- Matériel biologique.....	94
1. Méthode d'isolement de la souche.....	94
2. Identification de la souche SF15.....	95
3. Obtention de l'enzyme brut à partir de la culture de la souche de <i>Mucor SF 15</i> par fermentation en milieu solide.....	95
3.1. Repiquage de la souche <i>Mucor SF 15</i>	95
3.2. Préparation de l'inoculum.....	95
3.3. Préparation du milieu de fermentation	95
3.4.Inoculation des milieux de fermentation et extraction de l'enzyme brute.....	96
4. Purification partielle par fractionnement au sulfate d'ammonium de l'extrait enzymatique brut	97
5. Chromatographie d'exclusion moléculaire sur colonne semi preparative.....	97
II- Caractérisation de l'extrait enzymatique de <i>Mucor SF15</i>.....	97

1. Mesure de l'activité coagulante.....	97
2. Détermination de l'activité protéolytique.....	97
3. Taux de protéines.....	97
4. Détermination de l'indice AC/AP.....	97
5. Caractérisation de l'enzyme commerciale.....	97
III- Préparation des échantillons d'enzymes par coupage enzyme commerciale	
/enzyme <i>Mucor SF15</i>	98
1. Pourcentage de coupage.....	98
IV- Préparation de la pâte à fromage	98
1. Origine et physicochimie du lait.....	98
2. Méthodes de préparation de la pâte à fromage.....	99
3. Etapes de fabrication fromagère	99
4. Fabrication du fromage fondu à tartiner.....	101
4.1.Méthodes de la fabrication du fromage fondu à l'échelle de laboratoire.....	101
4.2.Analyses physicochimiques du fromage.....	103
V- Essai rhéologique des échantillons de fromage fabriqué à l'échelle de	
laboratoire	103
Résultats et discussion	105
I- Identification de la souche <i>Mucor SF 15</i>	105
II- Résultats de la fermentation de <i>Mucor SF15</i>	106
1. Obtention de l'enzyme coagulante.....	107
III- Résultats des purifications partielles	108
1. Purification partielle au sulfate d'ammonium.....	108
2. Emploi du gel filtration semi préparative dans la décoloration des extraits de	
<i>Mucor SF15</i>	109
3. Activités coagulantes des extraits enzymatiques.....	109
4. Concentration en protéines totales	110
5. Détermination de l'indice AC/AP de l'extrait de <i>Mucor SF15</i>	110
IV- Résultats de coupages enzyme commerciale/extrait coagulant de <i>Mucor</i>	
<i>SF15</i>	111
V- Résultats de la fabrication de la pâte à fromage	112

1. Analyses physicochimiques du lait.....	112
2. Pâte à fromage.....	113
3. Rendement fromager	113
4. Effet du coupage sur le rendement fromager	114
5. Résultats de la fabrication du fromage fondu.....	115
VI- Etude des propriétés rhéologiques du fromage fondu pour tartine fabriqué à l'échelle de laboratoire.....	117
1. Viscosité apparente.....	117
2. Contrainte.....	118
Conclusion	119
Références bibliographiques	120

Chapitre III : Propriétés biochimiques d'une protéase produite par la Souche *Bacillus velezensis FK6A* isolée du sol d'une laiterie en vue de son utilisation pour la fabrication d'un fromage à pate pressée cuite.

Introduction	123
Matériel et méthodes.....	123
I- Matériel biologique.....	123
1. Méthode d'isolement de la souche.....	123
2. Identification de la souche.....	124
3. Préparation de l'inoculum.....	124
4. Préparation et inoculation du milieu de culture.....	125
II- Caractérisation de l'extrait enzymatique brut (EEB).....	126
1. Extraction de l'enzyme coagulante.....	126
2. Mesure des activités enzymatiques.....	127
3. Détermination de l'indice AC/AP.....	127
4. Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique.....	127
5. Détermination des conditions optimales de l'activité coagulante.....	127
6. Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique brut.....	127
7. Analyse statistique.....	128

8. Effet de quelques effecteurs sur l'activité coagulante.....	128
III- Purification de l'extrait enzymatique brut.....	128
1. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	128
2. Dessalage de l'extrait enzymatique par dialyse.....	129
3. Chromatographie d'exclusion moléculaire (Gel filtration).....	129
4. Estimation du poids moléculaire.....	130
IV- Essai de fabrication du fromage à pate pressée cuite par l'utilisation de l'EEB.....	130
1. Etapes de fabrication du fromage.....	130
2. Analyses physico-chimiques du fromage.....	133
3. Analyse sensorielle du fromage.....	134
Résultats et discussion.....	135
I- Identification de la souche.....	135
II- Production d'enzyme coagulant le lait.....	135
1. Conditions de fermentation.....	135
2. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut.....	136
2.1. Activité coagulante de l'EEB.....	136
2.2. Activité protéolytique, indice AC/AP et teneur en protéine de l'EEB.....	137
2.3. Conditions optimales de l'activité coagulante.....	138
2.4. Etude de la stabilité de l'EEB.....	141
2.5. Effet de quelques effecteurs sur l'activité coagulante.....	143
3. Analyse statistique.....	144
III- Purification de l'extrait enzymatique brut.....	148
1. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	148
2. Purification de l'EEB par gel filtration.....	149
3. Paramètres de purification.....	150
4. Estimation du poids moléculaire.....	151
IV- Essai de fabrication d'un fromage à pâte pressée cuite.....	152

1. Analyses physico-chimiques du fromage élaboré type pâte pressée cuite.....	153
2. Rendement fromager.....	153
3. Analyse sensorielle du fromage.....	154
Conclusion	156
Conclusion générale	157
Références bibliographiques	161

Annexes

L'obtention de coagulants naturels de lait constitue un défi, car la disponibilité de la présure est limitée par rapport à la demande croissante de l'industrie laitière. Les coagulants naturels d'origine animale sont chers, et leur consommation a été limitée en raison de problèmes religieux ou alimentaires. Ce scénario a conduit à une demande croissante de nouveaux substituts de présure, favorisant la recherche de nouvelles sources de protéases ayant des propriétés coagulantes (**Mazorra-Manzano *et al.*, 2013**).

En effet, l'abondance relative, les caractéristiques biochimiques attrayantes et le potentiel biotechnologique de protéases végétales ont incité à un dépistage de ces enzymes chez différentes espèces de plantes sauvages (**Moreno-Hernández *et al.*, 2016**). La plupart des protéases purifiées à partir de plantes sont des protéases aspartiques, mais une activité de coagulation du lait a également été identifiée dans les protéases à cystéine et à sérine (**Shah *et al.*, 2014**).

Actuellement, les microorganismes représentent une excellente source de protéases, étant également la principale source de production. Bien que les enzymes protéolytiques puissent être obtenues à partir d'animaux et de plantes, les micro-organismes sont les principaux producteurs en raison de leurs avantages économiques et techniques, outre leur diversité biochimique et la possibilité de manipulation génétique (**Laxman *et al.*, 2015**).

La valorisation des sous produits d'origine végétale et microbienne dans la préparation des substituts de présure constitue une autre alternative pouvant avoir un intérêt industriel en fromagerie locale.

De Nos jours, le fromage est devenu un produit très important dans l'industrie laitière (**Fox *et al.*, 2016**). En plus d'être un produit largement consommé en raison de ses propriétés sensorielles, il est nécessaire de souligner le rôle important du fromage dans la nutrition humaine (**Ferreiro & Rodríguez-Otero, 2018; Zhi *et al.*, 2018**).

Les propriétés rhéologiques et sensorielles du fromage sont liées à l'activité enzymatique (**Amira *et al.*, 2017**). Les substituts de présure doivent avoir une activité protéolytique relativement faible pour maintenir la qualité du produit car une protéolyse excessive peut entraîner des pertes de rendement lors de la fabrication en raison de la dénaturation de la κ -caséine dans le lactosérum et du développement d'un goût amer dans le produit final (**Fox *et al.*, 2016; Mazorra-Manzano *et al.*, 2013**). Les substituts les plus importants qui répondent

aux exigences de la fabrication du fromage sont des enzymes microbiennes, recombinantes et à base de plantes (**Shah et Mir, 2014**).

C'est dans ce cadre d'investigation que nous avons entrepris l'étude des protéases coagulant le lait d'origine végétale (*Cynara scolymus*), bactérienne (*Bacillus velezensis*) et fongique (*Mucor SF15*). Notre étude permet d'une part, de mieux connaître les caractéristiques biochimiques de ces protéases : Purification, Inhibition, caractérisation des activités coagulante et protéolytique, séquençage des souches et d'évaluer leurs aptitudes technologiques d'autre part.

Ces travaux devraient montrer l'intérêt de l'utilisation des trois extraits étudiés comme succédanés de la présure traditionnelle dans la fabrication des fromages et l'étude des propriétés biochimiques, sensorielles et rhéologiques de fromages obtenus comparés à ceux fabriqués par la présure commerciale.

Dans un premier temps, des rappels bibliographiques généraux présentent la présure et ses succédanés d'origine végétale et microbienne ainsi les fromages fabriqués à base de ces présures de remplacement. Une partie est consacrée pour parler d'affinage de fromage et les différents événements biochimiques qui se produisent au cours de la maturation. De plus, une dernière partie qui entame les propriétés rhéologiques des fromages.

Concernant la partie expérimentale, un chapitre est consacré à chaque extrait enzymatique étudié ou il est rapporté une introduction, matériel et méthodes, résultats et discussion, une conclusion et les références bibliographiques.

Et enfin, une conclusion générale récapitule l'ensemble du travail précédent avec les résultats obtenus.

Références bibliographiques

Amira A. B., Besbes S., Attia H., & Blecker C. 2017. Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making : A review. *International Journal of Food Properties*, 20(1), p.p.76-93.

Ferreiro T., Rodríguez-Otero J. L. 2018. Evolution and distribution of phospholipids in cheese and whey during the manufacturing of fresh cheese from cows' milk. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), p.p.820-823.

Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., & McSweeney P. L. 2016. Fundamentals of cheese science. New York: Springer.

Laxman R. S., Sonawane A. P., More S. V., Rao B. S., Rele M. V., Jogdand V. V., Rao M. B. 2015. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry*, 40, p.p.3152–3158.

Mazorra-Manzano M. A., Moreno-Hernandez J. M., Ramirez-Suarez J. C., Torres-Llanez M. D., Gonzalez-Cordova A. F., & Vallejo-Cordoba B. 2013. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: a new vegetable source of milk-clotting proteases. *LWT e Food Science and Technology*, 54, p.p.325-330.

Moreno-Hernández J. M., Hernández-Mancillas X. D., Navarrete E. L. C., Mazorra-Manzano M. Á., Osuna-Ruiz I., Rodríguez-Tirado V. A., & Salazar-Leyva J. A. 2016. Partial Characterization of the Proteolytic Properties of an Enzymatic Extract From “Aguama” *Bromelia pinguin* L. Fruit Grown in Mexico. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(1), p.p.181–196.

Shah M. A., Mir S. A., & Paray M. A. 2014. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheese making: A review. *Dairy Science and Technology*, 94, p.p.5-16.

Zhi N.-N., Zong K., Thakur K., Qu J., Shi J.-J., Yang J.L., 2018. Development of a dynamic prediction model for shelf-life evaluation of yogurt by using physicochemical, microbiological and sensory parameters. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 42–49.

I- Présure et ses succédanés

Introduction

Le premier processus biochimique essentiel lors de la fabrication du fromage est la conversion du lait liquide en un gel mou, généralement noté caillé. Ce processus a été détecté par hasard des milliers d'années, et depuis lors, il a été avantageux de transférer le substrat très périssable en une forme plus stable, fromage. On a alors découvert que la formation du caillé est induite par une substance présente dans le quatrième compartiment de l'estomac des ruminants, l'abomasum. En raison de l'augmentation constante de la production mondiale de fromage, la demande de présure a commencé à dépasser l'offre disponible, et la recherche d'alternatives est donc devenue nécessaire dans le début des années 1960 (**Jaros et Rohm, 2017**).

De nombreux travaux de recherche ont été effectués sur les succédanés de présure afin de palier à cette pénurie de présure (**Eck, 2006**).

1. Présure

La coagulation enzymatique du lait est une étape cruciale dans le processus de la fabrication du fromage. La présure est un mélange d'enzymes protéolytiques et lipolytiques comme la chymosine, la pepsine et la lipase. Son activité est requise pour la coagulation enzymatique du lait. La présure est responsable de la dégradation des caséines par rupture des liaisons peptidiques covalentes de la K-caséine formée entre la phénylalanine et la méthionine (**Selin et al., 2018**). Le clivage enzymatique provoque la déstabilisation des micelles de la caséine qui sont agrégées et une matrice protéique tridimensionnelle est obtenue formant le caillé (**Fox et al., 2016 ; Amira et al., 2017**).

La protéolyse a pour rôle principale d'être responsable de la formation de caillé. De plus, elle est liée à la libération d'acides aminés précurseurs de réactions cataboliques dans lesquelles des composés aromatiques sont produits (**Katsiari et al., 2000 ; Hayaloglu & Karabulut, 2013 ; Fox et al., 2016**).

Dans la fabrication du fromage, la coagulation du lait est traditionnellement réalisée par la chymosine de la présure de veau obtenue à partir de l'abomasum des animaux allaités. La présure extraite d'abomasus de veau, de chevreau ou d'agneau étaient la principale source animale commerciale. D'autres enzymes sont capables d'initier la protéolyse, comme les protéinases aspartiques. Ils peuvent être extraits de certaines plantes, de microorganismes et de différents ruminants tels que l'agneau et la chèvre (**Balabanova et al., 2017; Selin et al.,**

2018). Actuellement, plus de 90% de la présure utilisée dans la fabrication fromagère, est une chymosine produite par fermentation.

Les propriétés rhéologiques et sensorielles du fromage sont liées à l'activité enzymatique (**Amira et al., 2017**). Les substituts de présure doivent avoir une activité protéolytique relativement faible afin de maintenir la qualité du produit car une protéolyse excessive peut entraîner une perte de rendement pendant la fabrication fromagère dues à la dénaturation de la κ -caséine dans le lactosérum et le développement du goût amer dans le produit final (**Fox et al., 2016**).

Pour cette raison, la chymosine est particulièrement adaptée à la fabrication du fromage en raison de sa faible activité protéolytique et sa forte activité de coagulation du lait. Les substituts les plus importants qui répondent aux exigences de la fabrication du fromage sont ceux d'origine microbienne, végétale et les enzymes recombinantes (**Shah et Mir, 2014**).

En effet, quatre sources de présure sont actuellement disponibles sur le marché: présure de veau, chymosine recombinante, présure végétale ou présure microbienne.

Selon **García-Gómez et al. (2019)**, il n'existe aucune étude comparant l'effet des quatre présures sur le même type de fromage.

2. Succédanés de présure

L'utilisation de la présure animale traditionnelle est limitée pour des raisons religieuses ou alimentaires. De plus, l'extraction et la purification de la présure de veau comportent plusieurs étapes et opérations, ce qui rend l'approvisionnement en enzymes très laborieux et coûteux (**Puglisi et al., 2013**). En outre, en raison de l'expansion de la production fromagère mondiale, la recherche de substituts s'est intensifiée (**Merheb-Dini et al., 2010**).

A cette fin, différentes protéases d'origine microbienne (**Ahmed et al., 2016; Narwal et al., 2016 ; Zhang et al., 2019**), végétale (**Mazorra-Manzano et al., 2013 ; Esposito et al., 2016; Shi et al., 2019**) et animale (**Kumar et al., 2006; Moschopoulou et al., 2006**) ont été utilisés.

2.1.Enzyme coagulante d'origine végétale

Les végétaux ont été les premiers objets de recherche en vue d'isoler les enzymes coagulantes. Celles-ci sont extraites par macération, de divers organes de plantes supérieures (**Manzoor et al., 2014**). Parmi ces espèces, on peut citer le gaillet (*Gallium verum*) qui a été et est encore utilisé dans des fabrications de fromages fermiers (**Vioque et al., 2001 ; Sousa et Malcata, 2002**).

D'autres espèces de climats tempérés, tel que le papayer (*Carica papaya*) (Low *et al.*, 2006; Adetunji et Salawu, 2008), le figuier (*Ficus carica*) (Nouani *et al.*, 2009 ; Baeyens-Volant *et al.*, 2015), l'ananas (*Ananas comosus*) (Cattaneo *et al.*, 1994) ont fait l'objet de plusieurs études. Malheureusement, toutes ces enzymes ont été jugées inappropriées car elles donnent un fromage extrêmement amer en raison de leur forte activité protéolytique (Lo Piero *et al.*, 2002 ; Ahmed *et al.*, 2009).

Une exception pour les extraits de fleurs de Genre *Cynara* et, en particulier, de *Cynara scolymus* et de *Cynara cardunculus* qui contiennent une multiplicité de protéases aspartiques de différentes formes moléculaires (Sarmiento *et al.*, 2009 ; Llorente *et al.*, 2014).

En effet, les fleurs séchées de cardon (*Cynara cardunculus*) ont été employées avec succès pendant des centaines d'années (Lamas *et al.*, 2001; Prados *et al.*, 2007 ; Sarmiento *et al.*, 2009). Les trois protéases aspartiques dans les extraits de *C. cardunculus*, initialement nommée cynarase 1–3 (cyprosin B correspondante à la cynarase 3) (Sampaio *et al.*, 2014), ont été identifiés comme glycoprotéines dimériques qui diffèrent par la taille de leur sous-unités, le degré de la glycosylation et l'activité de la coagulation du lait. D'une part, l'extrait de cette variété a été utilisé pendant longtemps dans la production des fromages artisanaux de lait de brebis (Sousa and Malcata, 2002 ; Sales-Gomes and Lima-Costa, 2008 ; Abellan *et al.*, 2012; Ordiales *et al.*, 2013). D'autre part, cette coagulase est largement employée en Portugal et en Espagne dans la préparation de certaines variétés de fromages traditionnels tels que Serra da Estrela, La Serena, Guía et Los Pedroches (Vioque *et al.*, 2000, Sousa et Malcata, 2002 ; Roseiro *et al.*, 2003 ; Liburdi *et al.*, 2018).

L'utilisation de la fleur de gingembre comme agent coagulant a été considérée comme l'un des facteurs déterminants de la qualité des fromages typiques portugais au lait de brebis (Agboola, 2002, Zhao *et al.*, 2003), l'extrait coagulant du rhizome de gingembre a fait l'objet de nombreuses études (Vioque *et al.*, 2001 ; Huang *et al.*, 2011 ; Hashim *et al.*, 2011).

Dans le cas de *C. scolymus*, l'activité protéolytique maximale à pH 5,0 ainsi que son inactivation par chauffage modéré, rendent cet extrait brut de protéase potentiellement utile pour la production de fromage (Llorente *et al.*, 2004; Sidrach *et al.*, 2005 ; Chazarra *et al.*, 2007 ; García *et al.*, 2014).

De plus, dans le but d'identifier des enzymes qui agissent de manière similaire à la présure, de nombreuses coagulases d'origine végétale ont fait l'objet d'études afin d'évaluer leurs propriétés protéolytiques et coagulantes. Parmi ces enzymes on peut citer celles issues de *Actinidia deliciosa* (Piero *et al.*, 2011; Grozdanovic *et al.*, 2013), *Onopordum acanthium* L. (Brutti *et al.*, 2012), *Euphorbia nivulia* (Badgajar et Mahajan , 2014), *Wrightia tinctoria*

R. Br (Rajagopalan et Sukumaran, 2018), *Pichia pastoris* (Feijoo-Siota et al., 2018), *Foeniculum vulgare* (Bey et al., 2018).

Esposito et al. (2016), dans une première étude sur l'immobilisation d'une protéase végétale extraite à partir de fleurs de chardon alpin, ont constaté que cette dernière a été immobilisée de manière covalente à l'aide d'un support polyacrylique contenant des groupes époxy-polaires. Les résultats ont montré que la protéase aspartique a été immobilisée avec succès à pH 7,0 sur des billes Immobeads IB-150P et que, dans ces conditions expérimentales un rendement d'immobilisation d'environ 68% et une récupération d'environ 54% ont été obtenus. Étant donné que l'enzyme présentait un pH optimal de 5,0, une valeur très similaire à celle généralement utilisée pour la coagulation du lait pendant la fabrication du fromage, et a présenté une stabilité satisfaisante dans le temps, l'utilisation de cette coagulase pour la production de nouveaux produits laitiers est suggérée.

Une étude sur l'optimisation des conditions d'extraction d'une protéase à partir de *Cynara cardunculus* par la méthodologie de surface de réponse réalisée par Ben Amira et al. (2017).

Les résultats ont montré que les conditions optimales d'extraction, correspondant à une activité de coagulation de lait (9,550 U.A.C / mL) ont été sélectionnés comme suit: temps de broyage 30 s, pH 3, temps d'extraction 50 min et rapport solide / liquide 15 g / 100 mL. Selon les propriétés technologiques, on peut en conclure que l'extrait de *C. cardunculus* a montré une excellente efficacité sur le lait cru en termes de fermeté du gel, par rapport à la chymosine et un bon temps de gélification. Par conséquent, la présure optimisée de *C. cardunculus* a le potentiel d'être employée comme agent efficace de coagulation du lait.

En outre, salehi et al. (2017), dans leur étude sur l'effet des sels sur l'activité enzymatique de la protéase de *Withania coagulans*, ont observé que le Na Cl et le CaCl₂ réduisent l'activité enzymatique. Ces caractéristiques de la protéase suggèrent que l'enzyme peut convenir à la fabrication de fromages à faible teneur en sel.

Récemment, li et al. (2018), dans une étude sur une protéase extraite à partir de fruit de tamarillo (*Cyphomandra betacea* Cav.), ont montré que cette enzyme a une activité optimale à pH 11 et une température de 60°C. Ainsi, le séquençage indiquait fortement que la protéase était une protéase à sérine alcaline analogue à la subtilisine. La protéase de tamarillo a été nommée tamarilline.

Les protéases brutes des feuilles de *Cynanchum otophyllum* Schneid ont été extraites et caractérisées par Luo et al. (2018). Ces auteurs ont mis en évidence l'existence de deux protéases à cystéine QA et QC avec des poids moléculaires respectifs de 14 et 27 kDa. Ces

deux protéases sont capables d'hydrolyser complètement la β -caséine et la κ -caséine. Par contre, l'hydrolyse est partielle pour α -caséine.

2.2. Enzymes coagulantes d'origine microbienne

Les microorganismes représentent une excellente source de protéases, étant également la source principale de production. Bien que les enzymes protéolytiques puissent être obtenues à partir d'animaux et de plantes, les micro-organismes sont les principaux producteurs en raison de leurs avantages économiques et techniques, outre leur diversité biochimique et la possibilité de manipulation génétique (**Sumantha et al., 2006 ; Wu et al., 2013 ; El-Tanboly et al., 2013 ; Laxman et al., 2015 ; Aguilar et Sato, 2018**). En effet, des protéases microbiennes mais surtout des protéases produites par des microorganismes génétiquement modifiés ont donné des résultats satisfaisants (**Jacob et al., 2011 ; Mahajan et Chaudhari, 2014**).

Beaucoup de protéases extracellulaires d'origine microbienne agissent de façon similaire que la chymosine et sont, en partie, adaptées à la production de fromage (**Robinson, 1998**). Ces protéases montrent une forte activité protéolytique pendant la fabrication du fromage, ce qui peut entraîner une perte de protéine, un rendement plus faible, et la génération de saveur désagréable (**Harboe et al., 2010**). L'enzyme de *Rhizomucor miehei* est le coagulant microbien le plus couramment utilisé pour la production fromagère et est disponible à différents degrés de thermo-stabilité et de pureté (**Jacob et al., 2011**).

En effet, la grande stabilité thermique a été l'inconvénient majeur de la première génération des protéases fongiques. Les modifications chimiques (**Smith et al., 1991**) et les outils du génie génétique ont été utilisés pour réduire cette stabilité thermique de ces enzymes (**Yamashita et al., 1994**). A la suite de ces modifications, il est devenu possible de produire d'excellents fromages affinés avec des coagulants fongiques modifiés.

À l'heure actuelle, la quasi-totalité des coagulants microbiens disponibles dans le commerce sont déstabilisables thermiquement en recourant en amont aux modifications chimiques (**Yegin et Dekker, 2013**).

2.2.1. Enzymes d'origine fongique

Plus de 100 sources microbiennes ont été signalées par **Garg et Johri (1994)**. De nos jours, les protéases microbiennes sont obtenues auprès de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* et *Cryphonectria parasitica* (**Sumantha et al., 2006 ; Yegin & Dekker, 2013 ;**

Balabanova et al., 2017). Ils ont été établis pour la production à grande échelle en cours de commercialisation et utilisés en fabrication du fromage (**Jacob et al., 2011**).

La protéase aspartique produite par *Rhizomucor miehei* est le coagulant microbien le plus couramment utilisé pour la production de fromage (**Jacob et al., 2011**). Cette enzyme est thermolabile.

Toutefois, de nombreuses études ont porté sur la production, la purification et la caractérisation des protéases produites par une souche bactérienne ou fongique spécifique (**Ozturkoglu-Budak et al., 2016**). L'objectif de ces études était généralement la détermination du potentiel de l'enzyme pour des applications spécifiques. En ce qui concerne les applications laitières, les sources microbiennes sont évaluées pour trouver des substituts aux enzymes, en raison de leur plus grande stabilité et de leur coût relativement inférieur. De plus, ces enzymes sont thermolabiles et possèdent des caractéristiques industrielles souhaitables pour la production de fromage (**Kumar et al., 2010**). En effet, Il existe plusieurs auteurs indiquent que les protéases fongiques sont efficaces dans la coagulation du lait, comme celles issues de *Mucor sp.* et *Rhizomucor sp.* (**Kumar et al., 2005; Merheb-Dini et al., 2010; Yegin et al., 2011; Leite Júnior et al., 2015**). Plusieurs protéases aspartiques fongiques ont été purifiés et caractérisés comme étant des succédanés de présures (**Mandujano-Gonzalez et al., 2016**). Les enzymes de type pepsine comprennent aspergillopepsine (aspergillopepsine I, EC 3.4.23.18) chez les espèces d'*Aspergillus* (**Vishwanatha et al., 2009**) et la rhizopuspepsine (EC3.4.23.21) pour les espèces de *Rhizopus* (**Kumar et al., 2005**). Ces enzymes ont des poids moléculaires compris entre 30 et 50 kDa et contiennent des résidus d'acide aspartique conservés sur le site actif (**Mandujano- Gonzalez et al., 2016**).

Da Silva et al. (2017), dans une première étude approfondie sur les propriétés biochimiques de la peptidase aspartique sécrétée par le champignon *Phanerochaete chrysosporium*, ont montré que cette coagulase possède un potentiel d'application considérable pour la production de fromage.

2.2.2. Enzymes d'origine bactérienne

Des études ont permis de mettre en évidence les potentialités de certaines bactéries à produire des coagulases. Ce sont surtout les genres *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*) et *Pseudomonas* qui ont été plus particulièrement explorés (**Green, 1977 ; ECK, 2006**). *Bacillus sp.* P45, isolé de l'intestin du poisson (*Piaractus mesopotamicus*) originaire du bassin amazonien (**Sirtori et al., 2006**), produit une enzyme qui présente un grand potentiel pour l'hydrolyse des protéines (**Daroit et al., 2009**).

Récemment, certaines souches de *Bacillus* non pathogènes produisent avec succès des enzymes coagulantes de lait, *Bacillus licheniformis* 5A5 (Ahmed et Helmy, 2012), *Bacillus subtilis* natto (Wu et al., 2013), *Paenibacillus* spp strain BD3526 (Hang et al., 2016), *Bacillus stearothermophilus* (Ahmed et al., 2016), *Bacillus subtilis* MTCC 10422 (Kumari Narwal et al., 2016), *Bacillus* sp. P45 (Lemes et al., 2016).

Wehaidy et al. (2018) dans une étude porte sur l'amélioration de la stabilité thermique d'une coagulase produite par *Bacillus subtilis* KU710517 par couplage covalent à certains polysaccharides oxydés et sur l'évaluation du polysaccharide le plus approprié pour la stabilisation d'enzymes, ont observé que parmi tous les conjugués, l'enzyme conjuguée au polyéthylène glycol (PEG) présentait l'activité retenue la plus élevée (551 U / mg de protéine) avec une activité récupérée de 95,3%. L'énergie d'activation de l'enzyme conjuguée au PEG a été estimée à 24,56 KJ.mol⁻¹, valeur inférieure à celle de la protéine native (29,27 KJ.mol⁻¹)

De plus, l'optimisation des facteurs de production et la caractérisation d'une souche bactérienne (*Bacillus subtilis* AU-2) isolée à partir de l'intestin de *Tribolium castaneum* par Patel et al. (2019) ont montré une production élevée de protéase (580 U / mL) dans un milieu (g / L) comprenant 10 g de tourteau de soja; 7,5 g glucose; 1,0 g KH₂PO₄; 1,0 g CaCl₂ à un pH 7,0 en utilisant une culture discontinue (60 tr / min) à une température de 37 ° C pendant 48 h. La purification de l'enzyme en trois étapes a permis d'obtenir une protéase purifiée 26,81 fois, ce qui a permis d'obtenir une activité spécifique de 22773 U / mg et une récupération de 34%. La protéase extracellulaire purifiée de *B. subtilis* AU-2 a une masse moléculaire de 38 kDa. Elle a été documentée en tant que métallo-protéase ayant un pH optimal de 7,5 et une température de 40 ° C.

3. Mécanisme d'action sur la caséine

La chymosine hydrolyse la liaison Phe105- Met106 de la κ -caséine avec une spécificité élevée, entraînant une instabilité des micelles de caséine et la coagulation ultérieure du lait (Egito et al., 2007). La plupart des enzymes commerciales de la coagulation du lait sont des protéases aspartiques qui présentent une spécificité de clivage semblable à la chymosine. Cependant, deux protéases microbiennes, *Cryphonectria parasitica* et *Endobia parasitica*, auraient une bonne activité de coagulation du lait avec l'hydrolyse de la liaison Ser104-Phe105 de la caséine κ (Jacob et al., 2011 b).

En effet, les protéases microbiennes présentent la même action protéolytique que la chymosine ou la pepsine pendant la fabrication du fromage. cependant, leur spécificité sur la caséine, la stabilité thermique et le taux résiduel dans le fromage lors de l'égouttage du lactosérum sont différentes (Fox et al., 2000). L'activité protéolytique de la protéase de

Rhizomucor miehei est supérieure à celle de la présure de veau, tandis que la présure de veau agit principalement sur la caséine α_{s1} alors que la protéase de *R. miehei* hydrolyse les deux caséines α_{s1} et β à un niveau similaire (Hayaloglu *et al.*, 2014). L'activité protéolytique des enzymes utilisées dans la fabrication du fromage est influencée par la rétention de l'enzyme dans le caillé qui est strictement liée au pH, à l'humidité du fromage et l'intensité de la cuisson du caillé. Il a été signalé que la stabilité thermique de la protéase de *R. miehei* était supérieure à celle des autres présures et que l'enzyme peut rester actif dans le caillé pendant la cuisson (Broome et Limsowtin, 1998).

Bien que les protéases de *Cynara cardunculus* produisent un fragment de macropeptide similaire de la k-caséine, l'hydrolyse de la caséine α_{s1} et β est décrite comme étant plus intense par rapport à la présure de veau, et *R. miehei* protéases (Macedo *et al.*, 1993; Ortiz de Apodaca *et al.*, 1994).

La caractérisation d'une protéase à sérine isolée de fruit du tamarillo (*Solanum betaceum*) et son activité d'hydrolyse de la caséine de lait ont été étudiées (Li *et al.*, 2018 a). Comparé à la présure de veau, un extrait brut de tamarillo présentait une activité caséinolytique plus large sur le caséinate de sodium. La protéase purifiée a été nommée «tamarilline» et a révélé une activité protéolytique vis-à-vis les caséines α , β et κ purifiées. Comme la présure de veau, la tamarilline hydrolysait de préférence la caséine κ , mais contrairement à la présure de veau, elle présentait également une activité protéolytique élevée vis-à-vis de la caséine α et β .

Tableau n°1 : Spécificité rapportée des enzymes de coagulation du lait d'origine végétale sur la κ -caséine bovine.

Origine de la protéase	Sources	Site de clivage préférentiel	Référence
Tamarilline - fruit de tamarillo	<i>Cyphomandra betacea</i>	Asn123-Thr124	Li <i>et al.</i> , 2018
Lettucine -laitue	<i>Lactuca sativa</i>	Arg97-His98, Lys111-Lys112, ou Lys112-Asn113	Lo Piero <i>et al.</i> , 2002
Cardosines A et B	<i>Cynara cardunculus</i>	Phe105–Met106	Sousa et Malcata, 1998
Graine d'Albizia	<i>Albizia lebbek</i>	Lys116-Thr117	Egito <i>et al.</i> , 2007
Graines de tournesol	<i>Helianthus annuus</i>	Phe105–Met106	Egito <i>et al.</i> , 2007
Graine de <i>solanum dubium</i>	<i>Solanum dubium</i>	Ser104-Phe105	Ahmed <i>et al.</i> , 2010

II- Fromage

1. Fromages à base de coagulase d'origine végétale

L'histoire de la fabrication artisanale de fromages révèle l'utilisation de plusieurs extraits de plantes comme coagulants dans le lait, même avec une activité protéolytique élevée (Jacob *et al.*, 2011 ; Shah *et al.*, 2013 ; Ben Amira *et al.*, 2017). Les cardosines de *Cynara cardunculus* sont un exemple qui a atteint le niveau de production de fromage commercial pour son goût et sa texture caractéristiques (Van Rooijen *et al.*, 2008). Une diversité de fromages fabriqués à partir de différentes sources de lait utilisant ces protéases végétales est disponible dans le monde entier. L'Espagne et le Portugal contribuent largement à différentes variétés (Roseiro *et al.*, 2003 ; Chazarra *et al.*, 2007 ; Shah *et al.*, 2013). Les habitants des collines dans les Ghâts du sud et de l'est de l'Inde utilisent l'extrait de *Wrightia tinctoria* pour la fabrication de fromages locaux (Rajagopalan et Sukumaran, 2018).

Compte tenu du succès de certaines enzymes dans la fabrication de fromages traditionnels dans diverses régions du monde, des essais de fabrication d'autres fromages ont été réalisés ces dernières décennies. Des études réalisées sur les extraits de *Cynara cardunculus L.* et de *Cynara humilis L.* ont montré, en accord avec leur contenu enzymatique similaire, que presque toutes les propriétés rhéologiques étaient similaires pour les deux coagulants. Comparés à la chymosine, ces derniers se sont révélés légèrement plus protéolytiques, conduisant à la formation d'un gel moins ferme (Esteves *et al.*, 2002; Vioque *et al.*, 2000).

Ainsi, Faccia *et al.* (2012) ont comparé le profil protéolytique de la cacioricotta de type artisanal, un fromage fait de lait de chèvre coagulé par un extrait de *Ficus carica sylvestris*, à la cacioricotta industrielle coagulée par la présure. Même avec un chauffage intense du lait, la forte activité protéolytique de l'extrait de *Ficus carica sylvestris* a conduit à la formation de grande quantité de peptides, contrairement à la présure.

Hashim *et al.* (2011) ont montré que l'influence de l'extrait de *Zingiber officinale* sur les propriétés physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles du fromage Peshawari fabriqué à partir de lait de vache, a été évaluée et comparée à celle de la présure. Seules les teneurs en azote soluble et en humidité ont présenté des différences significatives. Le fromage coagulé par l'enzyme du *Zingiber officinale* a présenté des niveaux d'humidité inférieurs et d'azote soluble plus élevés par rapport à celui coagulé par la présure. Aucune amertume n'a été notée dans le fromage fait avec l'extrait du *Zingiber officinale*.

L'extrait de *Withania coagulans* a été utilisé pour préparer le fromage Cottage au lait de buffle et comparé avec celui coagulé par la présure. Le type de coagulant n'a eu aucun effet significatif sur les propriétés organoleptiques, l'acidité, la quantité de protéines et de cendres des deux fromages. Néanmoins, le fromage coagulé par l'extrait de *Withania coagulans* avait une teneur en humidité plus élevée qui traduit une plus grande activité protéolytique de cette enzyme (**Khan et Masud, 2013**).

Utilisé pour la fabrication de fromages de type Gouda à partir de lait de vache, l'extrait de *Cynara scolymus L.* a affiché un rendement similaire à celui obtenu avec la présure. Toutefois, les fromages obtenus devaient être mis en saumure pendant une période plus longue pour empêcher une sur-protéolyse et éviter le développement d'amertume (**Llorente et al., 2014**).

Plusieurs auteurs ont passé en revue les différentes recherches effectuées sur les coagulants d'origine végétale. **Galán et al. (2012)** ont étudié les fromages à base de lait de brebis fabriqués par la présure de veau comparés à ceux fabriqués par l'extrait *Cynara cardunculus* au cours de l'affinage. Les résultats ont montré étudiés qu'aucune différence n'a été observée entre les coagulants utilisés concernant les paramètres chimiques et microbiologiques.

Les fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*) sont utilisées dans les pays méditerranéens pour la production de fromages artisanaux traditionnels en raison des protéases aspartiques (APs) présentes dans ces cultures. Un coagulant de *C. cardunculus* est utilisé comme présure dans l'élaboration de fromages à base des laits ovins et caprins de qualité supérieure, alors que les fromages issus de lait bovin présentent un goût excessivement amer (**Almeida Malaquias et al., 2017; Rincón et al., 2017**).

L'utilisation de mélanges de coagulants d'extrait aqueux de *Silybum marianum* et de chymosine pour la fabrication de fromages de vache miniatures a été fait par **Colombo et al. (2018)**. Les paramètres physicochimiques, sensoriels des fromages, et l'activité antioxydante *in vitro* ont été analysés et comparés aux propriétés obtenues à partir de fromages témoins à la chymosine. Les hypothèses proposées dans ce travail ont confirmé que l'extrait de fleur de *S. marianum*, en tant qu'une protéase ayant des caractéristiques distinctives, était apte à remplacer une partie de la présure animale habituellement utilisée dans la fabrication de fromages miniatures et a ainsi entraîné au développement d'un arôme intense dans le fromage tout en conférant une activité antioxydante *in vitro* à la fois au fromage et au lactosérum.

2. Fromages à base de coagulase d'origine microbienne

Alves et al. (2013) dans une étude menée sur la comparaison de l'effet de deux protéases fongiques, dont l'une est commercialisée (*Rhizomucor spp*) et l'autre produite à l'échelle du laboratoire (*Thermomucor indicae-seudaticae* N31), sur la composition, le rendement, et les caractéristiques sensorielles du fromage type « Prato ». Ces auteurs n'ont observé aucun effet significatif, pour les différents paramètres étudiés, entre les deux coagulants.

Lemes et al. (2016) ont étudié la capacité de coagulation du lait d'une protéase obtenue à partir de *Bacillus sp.* P45 et appliquer l'enzyme dans l'élaboration d'un fromage à la crème enrichi en farine de chia et de quinoa. Le fromage développé présentait une rétention d'eau élevée ($\geq 99,0\%$) et par conséquent un processus de synérèse faible. Les résultats indiquent que le produit fabriqué à l'aide de l'enzyme présentait des conditions sanitaires adéquates et que ses caractéristiques technologiques indiquaient que le produit était hautement stable et viable.

III- Affinage du fromage

La maturation du fromage est l'étape technologique la plus cruciale dans la fabrication du fromage, constituant une cascade de réactions biochimiques et microbiennes, qui confèrent les attributs sensoriels perçus. Ces attributs sensoriels sont évalués par divers méthodes descriptives, instrumentales et computationnelles (**Khattab et al., 2019**).

Plusieurs événements biochimiques se produisent au cours de la maturation, qui modifient les propriétés physiques et chimiques du fromage manufacturé, notamment trois réactions principales: le métabolisme du lactose résiduel, du lactate et du citrate, la protéolyse et la lipolyse (**McSweeney, 2011**).

Les enzymes qui participent au processus de maturation proviennent de différentes sources. Du lait, la lipoprotéine survit à la pasteurisation pour participer à la lipolyse. De la coagulation, la présure «chymosine» est retenue pour participer à la protéolyse. Les bactéries de départ, en plus de leur fonction principale de fermentation, fournissent des protéases et des estérases, entre autres. Le non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) et les cultures secondaires ou auxiliaires sont parmi les principaux contributeurs au processus de maturation en raison de leur forte activité métabolique (**Clark et al., 2009**).

1. Métabolisme des résidus de lactose, de lactate et de citrate

Le rôle des probiotiques dans le processus de fabrication du fromage, en particulier le développement des arômes, est essentiel pour deux raisons. Premièrement, les bactéries de

départ du lait, également appelées bactéries lactiques, métabolisent le principal glucide du lait, le «lactose», en lactate au cours de la fermentation via le processus de glycolyse. Le lactate est ensuite oxydé en acétate et CO₂ par les bactéries lactiques non starter (NSLAB) (Melchiorson *et al.*, 2002). Le lactate pourrait également être métabolisé en formate, acétate et CO₂ par NSLAB, puis converti en propionate, acétate, H₂O et CO₂ par *Propionibacterium sp.* Comme dans les fromages suisses, Il est simplement convertis en CO₂ et H₂O par *Penicillium sp.* (Hassan *et al.*, 2013). Ce processus est responsable de l'acidification du fromage. Par la suite, le lactate confère au fromage une saveur acide distincte et est l'une des raisons de l'acidité de certains types de fromage (Iwasawa *et al.*, 2014).

Deuxièmement, les cultures bactériennes annexes et NSLAB sont les principaux contributeurs à la maturation. Processus par lequel la majeure partie de la saveur du fromage se développe. Il a également été signalé que certaines souches de *Lactococcus* peuvent absorber le glutathion, qui contient du soufre; un aspect important de la saveur du fromage (Fox *et al.*, 2017). La variété de saveurs et d'arômes de fromage parmi les différents types provient de l'incorporation de différents probiotiques secondaires dans le processus de production (Andiç, Tunçtürk et Boran, 2014). Les types de fromage sont en fait classés en fonction de leur méthode d'affinage (McSweeney, 2011).

2. Protéolyse et métabolisme des acides aminés

La protéolyse est le processus responsable du métabolisme de différentes caséines, c'est-à-dire α s1, α s2, β et κ -caséine, présente dans le lait sous forme de peptides plus petits et d'acides aminés libres par les protéinases endogènes du lait et d'autres enzymes protéolytiques de cultures de levain (Gan *et al.*, 2016).

La chymosine commence la coagulation du lait par clivage de la caséine en peptides amers hydrophobes courts. Le processus de métabolisation de la caséine induit des modifications texturales du fromage (Clark *et al.*, 2009). Les protéinases et les peptidases catalysent le clivage des chaînes de polypeptides pour produire des acides aminés libres qui subissent plusieurs réactions biochimiques qui confèrent le goût au fromage (McSweeney, Ottogalli, & Fox, 2004).

Plusieurs facteurs ont une incidence sur la protéolyse et la génération de composés aromatisants décrits ci-dessus, ce qui expliquerait la différence d'arôme de fromage de différents fabricants :

- La période de maturation affecte le degré de protéolyse. À mesure que la durée de conservation du fromage augmente, le degré de protéolyse augmente également. La

texture du fromage devient fragile plutôt que ductile avec le temps (**Joyner (Melito), Francis, Luzzi, & Johnson, 2018**).

- Le degré de protéolyse varie également selon le type de fromage. La mozzarella subit une protéolyse limitée, le cheddar et le gouda subissent une protéolyse modérée, tandis que les fromages bleus doivent subir une protéolyse poussée (**Clark et al., 2009**). Ces différences de degré de protéolyse se reflètent dans le niveau d'amertume du fromage. Les fromages bleus subissant une protéolyse poussée, ils ont des saveurs vives, amères et moisies, et odeurs piquantes. L'ajout de cultures annexes augmente la protéolyse et la quantités d'acides aminés libres dans le fromage (**Andiç et al., 2014**).
- L'emballage affecte également la formation de composés volatils. Si l'emballage sous vide est utilisé, il y aura moins de production d'ammoniac et moins de protéolyse en général (**Duval et al., 2018**).

3. Lipolyse et métabolisme des acides gras

Les triglycérides du lait sont hydrolysés par les enzymes bactériennes et endogènes du lait en acides gras à courtes et moyennes chaînes et en acides gras libres par la lipolyse (**Collins et al., 2003**). Les acides gras à chaîne courte jouent un rôle important dans le développement de la saveur mais une lipolyse intense pourrait être indésirable chez certaines variétés de fromages en raison de l'évolution de la rancidité observée dans les fromages Cheddar, Gouda et Suisse (**Forde et Fitzgerald, 2000**). Cependant, la lipolyse extensive est favorisée dans le fromage bleu, l'Emmental, le parmesan et les fromages italiens tels que Romano et Provolone (**Clark et al., 2009**). Lors de la lipolyse, les enzymes coupent les liaisons ester entre les acides gras et le glycérol dans les triacylglycérides. Les estérases hydrolysent les chaînes d'esters d'acyle courtes (C -C), tandis que les lipases hydrolysent les chaînes d'esters d'acyle plus longues, composées de plus de 10 atomes de carbone (**Collins et al., 2003**). Plusieurs acides gras à chaîne courte, à savoir les acides hexanoïque, octanoïque et décanoïque, contribueraient à la saveur et à l'arôme du fromage. L'acide hexanoïque est responsable des arômes de sueur, de piquant et de rance (**Clark et al., 2009**). L'acide octanoïque a une saveur caprine et l'acide décanoïque confère des odeurs grasses d'agrumes (**Gan et al., 2016**), tandis que l'acide dodécanoïque dégage des odeurs grasses (**Clark et al., 2009**). Dans le développement de la saveur du fromage, la lipolyse joue un rôle considérable. En effet, la plupart des acides gras libres générés à partir de la lipolyse sont des composés aromatiques mais aussi des précurseurs d'autres composés volatils comme des aldéhydes, des esters, des lactones et des alcools secondaires (**Guizani et al., 2006**).

IV- Propriétés Rhéologiques du fromage

1. Quelques définitions fondamentales

➤ Rhéologie

La rhéologie est définie comme la science de la déformation et du flux de la matière. Le terme vient du grec «rheos» qui signifie «couler». Ce nom a été inventé en 1920 par Eugene C. Bingham, professeur au Lafayette Collège (**Steffe, 1996**). La rhéologie s'applique à tous les types de matériaux, de gaz aux solides. En science des aliments, la rhéologie est utilisée pour définir la consistance des différents produits basés sur la viscosité (épaisseur, manque de glissance) et l'élasticité (caractère collant, structure). Par conséquent, dans les applications pratiques, la rhéologie indique la mesure de la viscosité, la caractérisation du comportement de l'écoulement et la détermination de la structure du matériau (**Muthukumarappan et Swamy, 2017**).

Roudot, (2002) a décrit la consistance d'un fromage à partir d'un ensemble des paramètres rhéologiques de sens physique précis : module d'élasticité, viscosité et temps de relaxation. Dans son étude réalisée sur divers fromages, il conclue, qu'en générale, le fromage est un corps viscoplastoélastique, car lorsqu'il est soumis à une contrainte (pression, pénétration, cisaillement, etc.), il présente une combinaison de déformation élémentaire relevant de l'élasticité, de la viscosité et de la plasticité. Ce comportement peut être différent d'un fromage à un autre selon l'importance et le type de contrainte imposée. De ce fait, on peut dire que chaque fromage, à un instant donné de son affinage, constitue une entité rhéologique et que de nombreux paramètres sont susceptibles de modifier son comportement (**Hardy et Scher, 1997**).

➤ Concepts de base

La rhéologie traite de la relation entre contrainte, stress et temps (**Blair et al., 1947**). La contrainte et le stress sont étroitement liés à la déformation et à la force. Les contraintes rendent compte de l'effet de la taille sur la déformation du matériau due à la différence de dimensions de l'échantillon alors que la contrainte rend compte de l'effet de la taille sur la force appliquée en raison de la différence de section des échantillons. En utilisant la contrainte et le stress, les rhéologues sont capables d'obtenir les propriétés réelles du matériau indépendamment de la taille et de la géométrie de l'échantillon et de comparer les résultats des tests sur des échantillons de différentes tailles et géométries (**Gunasekaran et Ak, 2002**).

Contrainte (stress) τ : Force de contact qui s'exerce sur une facette limitant un élément de volume infiniment petit, rapportée à la surface de cette facette. Elle s'exprime donc en N.m^{-2} ou Pa (**Groupe française de rhéologie, 1990**).

$$\tau = F/S$$

F : force de contact (ex : force de compression) ;

S : surface de contact.

➤ **Déformation (strain)**: Modification des distances mutuelles des différents points d'un corps.

Elle se traduit toujours par des changements relatifs de longueur et/ou des variations d'angle, en radians, qui sont donc des nombres sans dimension (**Groupe française de rhéologie, 1990**).

Dans le cas d'une extension ou une contraction selon un seul axe (axe X), la déformation selon Cauchy :

$$e_{xx} = \Delta l / l_0$$

➤ **Liquide** : on dit un corps qu'il est liquide si, sous l'effet d'une contrainte, aussi petite soit-elle, il se déforme indéfiniment, sauf s'il s'agit d'une compression hydrostatique. Il est soumis à un phénomène d'écoulement caractérisé par des vitesses de déformation.

La propriété physique qui relie contrainte et vitesse de déformation correspondante est la viscosité noté η . Elle s'exprime par le quotient d'une contrainte par une vitesse de déformation, c'est-à-dire en Pa.s (Pouseuilles).

$$\eta = \tau / \dot{\gamma}$$

➤ **Solide** : un corps est dit solide si, soumis à des contraintes inférieures à certaines limites, il subit des déformations finies. Si le solide tend à reprendre, après suppression de la sollicitation, sa forme et ses dimensions antérieures, il possède des propriétés élastiques.

L'étude des propriétés rhéologiques d'un solide élastique consiste donc à établir des relations entre des contraintes et des déformations réversibles (**Launay, 1991**).

➤ Viscoélasticité

🚧 Solide élastique idéal

L'application d'une force sur un matériau solide entraîne généralement une déformation qui se traduit par un changement de la forme de dimensions. La contrainte, notée σ ou τ , est la force appliquée par unité de surface du matériau. Elle peut être appliquée à la surface dans une direction normale, entraînant une compression (par exemple, une réduction de la hauteur de l'échantillon) ou une extension (par exemple, une augmentation de la taille de l'échantillon) (**Figure 1(a)**). En effet, la contrainte peut être appliquée de manière tangentielle à la (aux) surface (s), ce qui provoque le glissement des couches adjacentes du matériau les unes par rapport aux autres dans une direction parallèle à leur plan de contact (**figure 1 (b)**).

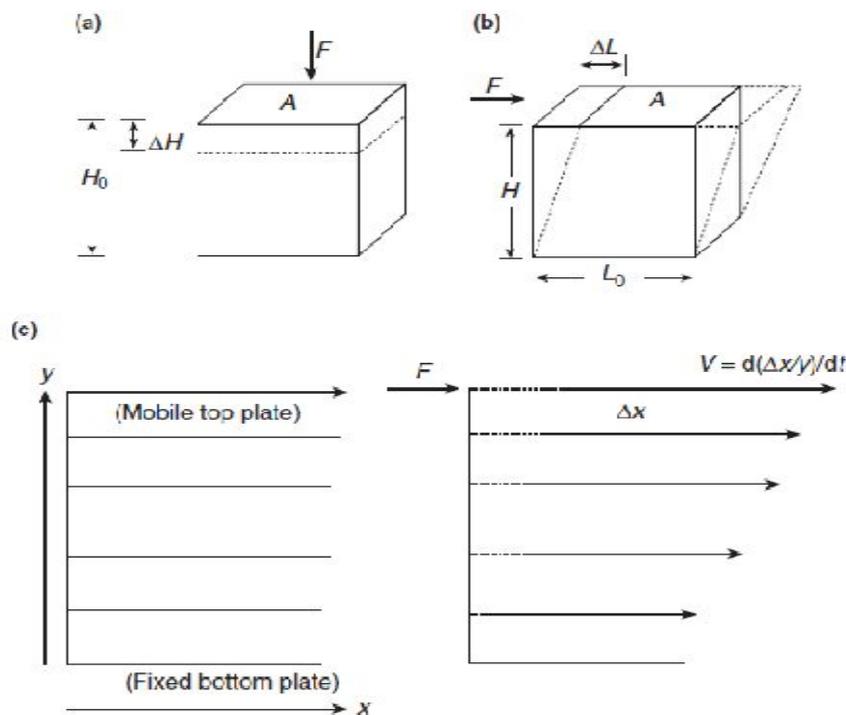


Figure n°1: Application de contraintes (force, F , par unité de surface, A) sur un matériau solide (**a**, **b**) ou liquide (**c**). Pour le matériau solide, la contrainte peut être appliquée (a) dans la direction normale à la surface entraînant une déformation par compression (ΔH) ou (**b**) tangentielle à la surface entraînant une déformation en cisaillement (ΔL). Pour le matériau liquide, confiné entre deux plaques parallèles (une plaque inférieure fixe et une plaque supérieure mobile) séparées par une distance y , l'application d'un effort de cisaillement sur la plaque supérieure entraîne un mouvement dans la direction x à la vitesse V (**Guinee ,2011**).

Un matériau est décrit comme un solide élastique idéal ou hookéen si la relation entre σ et ε , ou si τ et γ est linéaire, avec la courbe de σ en fonction ε passant par l'origine (**figure n°2, a**). Deux types de modèles sont obtenus pour un solide idéal basés sur la méthode d'application de contrainte:

- a- modèle d'élasticité ou modèle de Young (E), où la contrainte est normale à la zone soumise à la contrainte, $\sigma = E \varepsilon$ ou $\varepsilon = \Delta H/H$;
- b- modèle de cisaillement élastique (ou de stockage) (G'), où la contrainte est tangentielle à un plan fixe, $\tau = G' \gamma$ et $\gamma = \Delta L / H$.

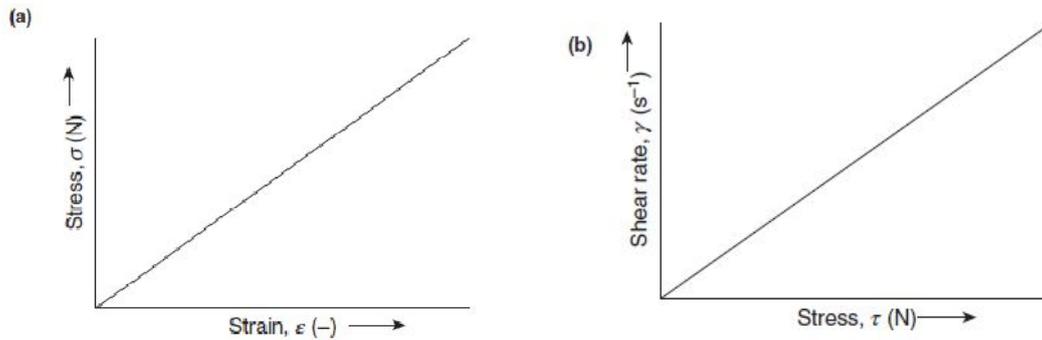


Figure n°2 (a, b) : Relations entre contrainte, σ et déformation, ε , pour un solide élastique (a) et entre contrainte de cisaillement, τ , et vitesse de déformation, γ' , pour un liquide idéal (b) (Guinee, 2016).

🚩 Liquide Visqueux Idéal

Contrairement à un solide idéal, un liquide ne supporte pas un stress permanent; la contrainte change constamment tant que le stress est maintenu. Lors de l'application d'une contrainte de cisaillement, σ , à un liquide confiné entre deux plaques parallèles (plaque flottante supérieure et plaque stationnaire inférieure) séparées par une distance y (Figure n°1,c), la plaque supérieure se déplace d'une distance (Δx) dans la direction x à une vitesse (v), donnée par : $v = \Delta x/y$. Un liquide idéal ou newtonien si γ' est directement proportionnel à τ , avec la courbe τ en fonction de γ' passant par l'origine (figure n°2, b).

2. Méthodologies de mesure de la rhéologie du fromage

Selon Guinee (2016), les méthodes utilisées pour évaluer les caractéristiques rhéologiques du fromage peuvent être classées comme sensorielles ou instrumentales; les méthodes instrumentales peuvent être encore classées comme empiriques ou fondamentales.

2.1.Méthodes sensorielles

Le but des méthodes sensorielles, couramment utilisées par les classeurs de fromages, est d'acquiescer une idée de la façon dont la texture de fromage est perçue pendant la consommation. La texture du fromage peut être définie comme un attribut sensoriel composite résultant d'une combinaison de propriétés physiques perçues par les sens du toucher (y

compris la kinesthésie et la sensation en bouche), la vue et l'audition. Les conditions de test sont arbitraires et impliquent fréquemment de soumettre le fromage à une déformation entraînant une fracture visuelle, par exemple: comme en frottant le fromage entre les doigts jusqu'à ce qu'il devienne pliable, et la flexion avec les doigts d'un morceau de fromage cylindrique et jauger mentalement la force nécessaire pour le plier ou le casser.

L'évaluation peut également être en appliquant des forces ou des déformations ne provoquant aucune fracture visible, par exemple en pressant la boule du pouce dans la surface d'un fromage entier et en mesurant mentalement le degré d'indentation ou la force exercée sur les doigts. Dans tous les cas, une impression mentale est formée et le correcteur attribue un score, basé sur un ou plusieurs critères, tels que les conditions de test et la réponse.

2.2.Méthodes instrumentales empiriques

Ces tests consistent à soumettre un échantillon de fromage à une contrainte ou une déformation à l'aide de divers instruments. Les différents types de test comprennent :

- ✚ Des tests de compression imitative utilisant divers instruments (un tendomètre, un texturomètre) qui ont tenté de simuler l'évaluation sensorielle de la texture lors de la consommation (coupe, et / ou mastication des dents (incisives, molaires)) par mesurer les forces impliquées lors de la compression de l'échantillon de fromage à l'aide de divers dispositifs (des mâchoires en forme de dent) ;
- ✚ Des tests de compression, où l'ampleur de la compression (déformation) sous une charge constante (force) pendant un temps spécifié, est mesurée (par exemple, le test du compresseur à bille) pour fournir un indice de dureté ;
- ✚ Des tests de pénétration (perforation), dans lesquels la force requise pour insérer un cône ou une sonde sur une distance donnée dans le fromage, ou bien on mesure la profondeur de pénétration d'un cône / d'une sonde ou d'une aiguille sous une charge constante pendant un temps donné (pénétrromètre) ;
- ✚ Des tests de coupage, dans lesquels la résistance au passage d'un fil de fer à travers un fromage est mesurée (un tensiomètre Cherry-Burrell).

2.3.Méthodes instrumentales fondamentales

Ceux-ci peuvent être classés en tant que faible déformation ou grande déformation.

Les tests de faible déformation impliquent l'application de déformations qui se situent dans la limite viscoélastique linéaire du fromage (par exemple, $<0,05$), alors que les méthodes de

déformation importante impliquent des déformations entraînant la rupture de la structure au moins au niveau microstructural et parfois aussi au niveau macrostructural.

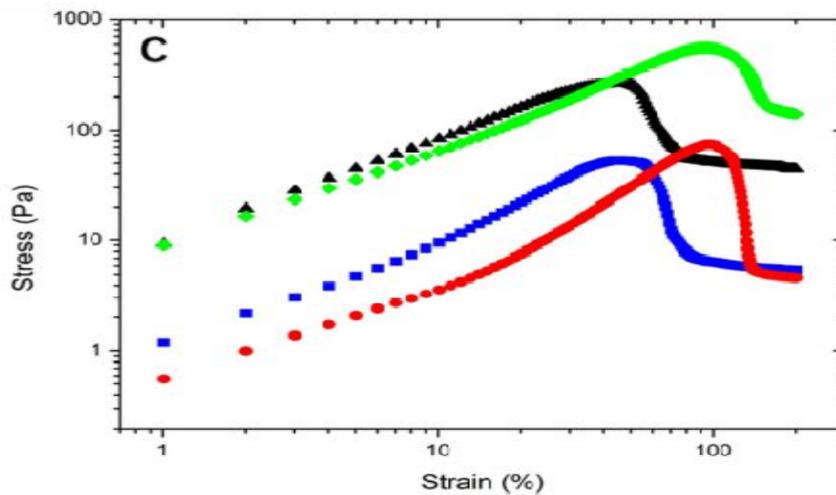


Figure n°3: Mesures rhéologiques à grande déformation de laits gélifiés avec addition de la protéase de tamarilline. Les symboles correspondent à: 10% (p / p) de gel au lait induit par la présure ■ ; 10% (p / p) de gel au lait induit par la tamarilline ● ; 20% (p / p) de gel au lait induit par la présure ▲ ; et 10% (p / p) de gel au lait induit par la tamarilline ◆ (Li *et al.*, 2018).

Test de compression : compression uniaxiale

La compression uniaxiale est le test le plus adapté pour estimer les propriétés rhéologique du fromage. Ce test est le plus utilisé probablement parce qu'il est facile à exécuter et qu'il n'est pas nécessaire de saisir un échantillon (Luyten *et al.*, 1992).

La quasi-totalité des tests de compression du fromage sont effectués avec l'un des instruments les plus polyvalents communément appelé machines d'essai universel (Universal Testing Machine). L'UTM fournit un contrôle précis de la déformation tout en mesurant avec précision la force. Les UTM peuvent être utilisés pour effectuer la compression ainsi que les essais de traction, de flexion et de cisaillement (Velmurugan *et al.*, 2004).

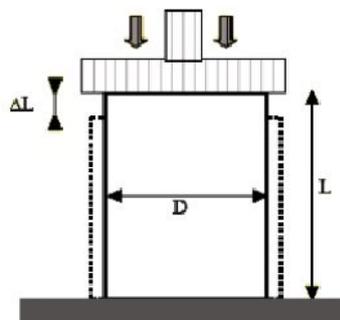


Figure n°4: Test de compression uniaxial (Lanoisellé, 2006).

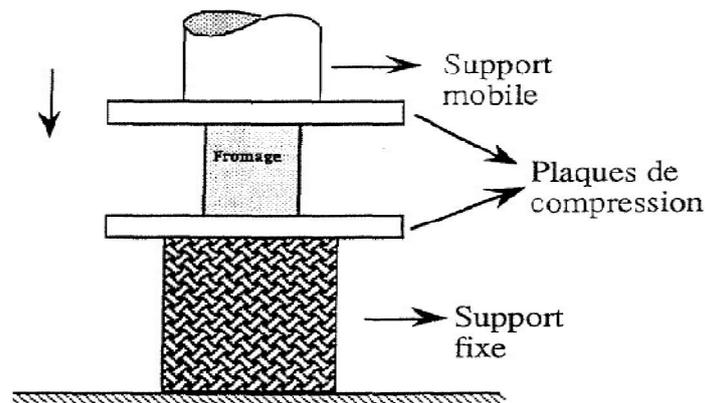


Figure n°5 : Schéma du système expérimental pour étudier le comportement rhéologique par compression du fromage (Dantas Cavalcante, 1995).

3. Facteurs influant sur la rhéologie du fromage

a- Composition du fromage

La viscoélasticité du fromage résulte des contributions rhéologiques interactives de ses constituants individuels (protéines, lipides et humidité).

➤ Teneur en protéines

Lors de l'application d'une contrainte sur le fromage, le réseau de para-caséines contrôle d'abord la déformation. Par conséquent, il existe des corrélations positives significatives entre le contenu de la caséine et la fermeté du fromage (**Figure n°6**) (Visser, 1991).

La teneur en caséines du lait a une influence significative sur les propriétés rhéologiques du gel, sur sa vitesse de formation et sa fermeté maximale (Park *et al.*, 2007).

➤ Teneur en matière grasse

La contribution des matières grasses aux propriétés rhéologiques du fromage dépend de sa fraction volumique et de sa température. La température détermine le rapport entre la matière grasse solide et la matière grasse liquide. À basses températures ($< 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), la matière grasse du lait est essentiellement solide et augmente l'élasticité du réseau de caséines. Cependant, la contribution de la matière grasse à l'élasticité décroît rapidement à mesure que le rapport entre la matière grasse solide et la matière liquide diminue avec l'augmentation de la température et est très bas à $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, toute la matière grasse du lait étant liquide (Visser, 1991).

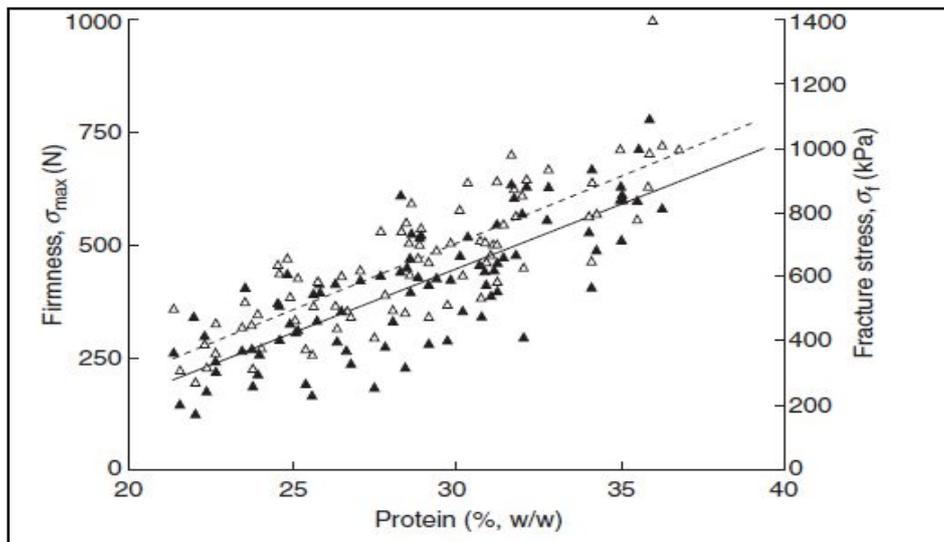


Figure n°6: Variation de la fermeté et du stress de fracture en fonction de la teneur en protéines dans les fromages Cheddar comprimés à 25% de la taille initiale (**Guinee, 2016**).

➤ Humidité

L'augmentation de la teneur en humidité du fromage, tout en maintenant les autres paramètres de composition relativement constants, a pour résultat la réduction de l'élasticité, la force de la matrice du fromage à se déformer et la fermeté. L'indice de fragilité (ϵf) augmente légèrement avec la teneur en humidité dans une mesure qui dépend du pH et de la maturité du fromage (**Guinee, 2016**).

b- Teneur en sel (NaCl)

Augmenter la concentration du fromage en sel pour le type Gouda, dans la plage de 0 à 12% (p / p), tout en maintenant la composition des autres paramètres relativement constante, est associé à une augmentation de l'élasticité, la force de la matrice du fromage à se déformer et la fermeté (**Guinee, 2016**). Cependant, la teneur en sel exerce également un effet sur l'hydratation de la caséine et le volume du réseau de caséine, et est donc susceptible d'influencer la rhéologie du fromage (**Pastorino et al., 2003**).

c- pH

Dans un intervalle du pH allant de 4,8 à 5,2, il a été constaté que l'élasticité et la ϵf étaient réduites dans les fromages Cheddar et Gouda. En revanche, en augmentant le pH de 5,2 à 5,6, on constate une nette augmentation de la FS (à des valeurs beaucoup plus élevées que celles à pH <5,2) et une légère augmentation de E. Chez le jeune Gouda (âgé d'une semaine), l'indice de fragilité était maximal à pH 5,2 et diminuait en abaissant le pH à 4,8 ou augmenter le pH à 5,6 (**Guinee, 2016**).

d- Affinage du fromage

La force de la matrice du fromage à se déformer et la fermeté du fromage diminuent généralement avec la durée d'affinage en raison de l'hydrolyse et de l'hydratation des brins de caséine, les deux contribuent à la réduction de la force et de l'élasticité du réseau de caséines (**Guinee, 2016**).

McCarthy et al., (2016) dans une étude menée sur l'effet de la réduction de sel ,pendant la période d'affinage, sur la rhéologie des fromages ont constaté que la déformation à la rupture (ϵ_f) était influencée de manière significative par la variation de la concentration en sel, la période d'affinage et l'interaction du sel et le temps de maturation. Le ϵ_f a augmenté de manière significative dans la plupart des fromages au cours des 150 et 210 premiers jours, ensuite diminue. De même, **Watkinson et al. (2001)** ont constaté que ϵ_f de fromages à pâte demi-ferme ont augmenté de façon continue au cours d'un d'affinage à 4 ° C pour un pH allant de 5.2 et 5.8. Cette tendance contraste avec celle rapportée par **Visser (1991)**, qui a constaté que le ϵ_f du Gouda a diminué de façon continue avec le temps, période de maturation de 9 mois. Cependant, contrairement aux fromages étudiés par **McCarthy et al., (2016)** et ceux de **Watkinson et al. (2001)**, où l'humidité est constante pendant la période d'affinage, la teneur en humidité du fromage Gouda a diminué d'environ 43% en 2 semaines (**Visser, 1991**).L'écoulement des fromages augmente de manière significative au cours de l'affinage, l'augmentation est plus marquée au cours des 30 premiers jours. Cette tendance a été observée pour divers types de fromages, notamment les fromages Cheddar (**Guinee et al., 2000; Olson et al., 2007**) et Mozzarella (**Henneberry et al., 2015**) . Cette augmentation a été expliquée par l'élévation de l'hydrolyse et de l'hydratation de la caséine (**Guinee et al., 2000**). En effet, l'étude des effets de la température d'affinage sur la texture et les propriétés fonctionnelles des fromages de Mozzarella à faible teneur en eau par **Guinee et al. (2001)** a montré que l'élévation de la température de stockage, au cours de la période d'affinage (70 jours) , sur les caractéristiques fonctionnelles du fromage fondu a été attribuée principalement à la réduction concomitante du contenu en caséine intacte qui a été négativement corrélée à l'aptitude à l'écoulement et positivement à la viscosité apparente et au point de fusion.

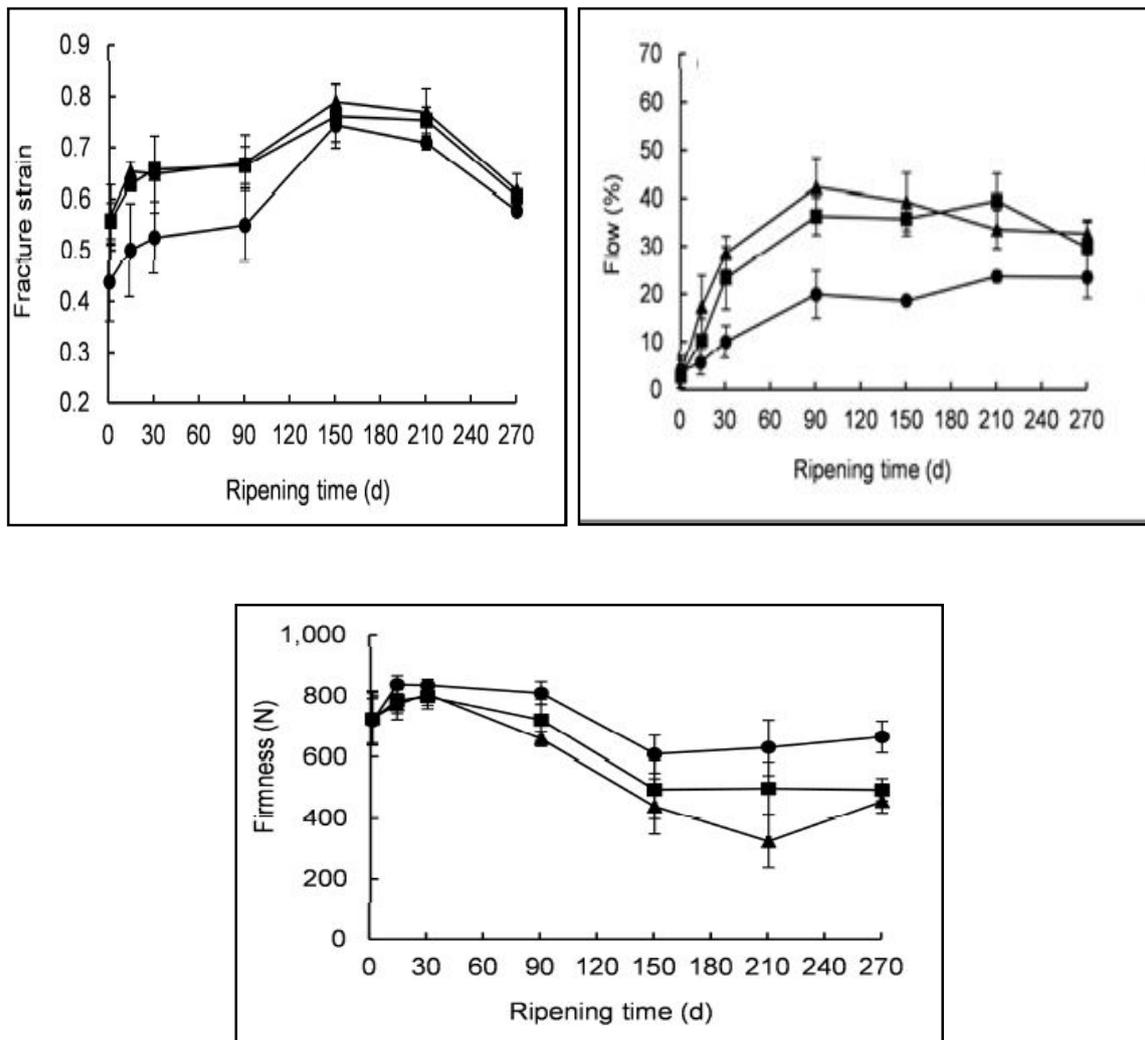


Figure n°7: changement de la déformation à la rupture, l'écoulement (lors de chauffage) et la fermeté du fromage type Cheddar avec différente concentration en sel pendant la période d'affinage McCarthy *et al.*, (2016).

Tableau n°2: modélisation des propriétés rhéologiques de quelques types de fromages

Fromage	Objectif	Modèle	Résultats	Référence
Cheddar	Observer la viscoélasticité linéaire du fromage à 40 ° C et un stress de 1119,5 Pa	Six éléments Modèle Kelvin	L'indice de viscoélasticité a la capacité de différencier la fusion de fromages Cheddar à différents âges et à différentes teneur en matières grasses.	(Kuo <i>et al.</i> , 2000)
Mozzarella	Observer l'effet de methocel comme liant d'eau sur les propriétés viscoélastiques de fromage mozzarella au début de stades de maturation.	Six éléments modèle Voigt – Kelvin	La Mozzarella au lait écrémé à 0,2% de Méthocel était plus mou avec un fluage et une conformité de récupération plus élevé en raison de l'amélioration la capacité de rétention d'eau.	(Subramanian <i>et al.</i> , 2003)
Edam	Pour comparer l'influence de l'utilisation deux sondes (une plaque de 100 mm et une sonde sphérique de 5 mm) au cours d'un test de compression sur les tendances de changements de dureté pendant l'affinage.	Modèle Peleg	les valeurs de dureté du fromage au cours de période d'affinage déterminée par les sondes sont fortement corrélées entre elles et aussi avec la rigidité évaluée par la méthode sensorielle.	(Buñka <i>et al.</i> , 2013)
Siahmazgi	Evaluer les spécifications rhéologiques pendant l'affinage.	Modèle Peleg	L'elasticité était supérieure à la nature visqueuse des échantillons en termes de dominance du facteur stockage sur le facteur affinage.	(Farahani <i>et al.</i> , 2014)

Références bibliographiques

- Abellan A., Pino A., Martinez-Cahe A., Salazar E., Tejada L., 2012.** Free amino acid content of goat's milk cheese made with animal rennet and plant coagulant. *J. Sci. Food Agric.* 92, p.p.1657–1664.
- Adetunji V. O., et Salawu O. T. 2008.** West African soft cheese 'wara' processed with *Calotropis procera* and *Carica papaya*: a comparative assessment of nutritional values. *African Journal of Biotechnology*, 7, p.p.3360-3362.
- Ahmed I.A.M., Morishima I., Babiker E.E., Mori N., Dubiumin, 2009.** A chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen, *Phytochemistry*, 70 (4), p.p.483-491.
- Ahmed I. A. M., Babiker E. E., & Mori N. 2010.** pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. *LWT-*
- Ahmed S. A., Helmy W. A., 2012.** Comparative evaluation of *Bacillus licheniformis* 5A5 and *Aloe variegata* milk-clotting enzymes. *Journal of Chemical Engineer.*, 29 (1), p.p.69 - 76.
- Ahmed S. A., Wehaidy H. R., Ibrahim, O. A., El Ghani, S. A., & El-Hofi, M. A. 2016.** Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, p.p.241–249.
Food Science and Technology, 43(5), p.p.759–764.
- Almeida Malaquias C., Manso J. A., Figueiredo A. C., Antunes L., Cruz R., Manadas B., Bur, D., Barbosa Pereira P. J., Faro C., & Simões I. 2017.** Functional and structural characterization of synthetic cardosin B-derived rennet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(18), p.p.6951-6968.
- Alves L. S., Merheb-Dini C., Gomes E., da Silva R., & Gigante M. L., 2013.** Yield, changes in proteolysis, and sensory quality of Prato cheese produced with different coagulants. *Journal of Dairy Science*, 96(12), p.p.7490–7499.
- Amira A. B., Besbes, S., Attia H., & Blecker C. 2017.** Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(1), p.p.76–93.
- Badgujar S.B., Mahajan R.T., 2014.** Nivulian-II a new milk clotting cysteine protease of *Euphorbia nivulia* latex, *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, p.p. 391–398.
- Baeyens-Volant, D., Matagne, A., El Mahyaoui, R., Wattiez, R., & Azarkan, M., 2015.** A novel form of ficin from *Ficus carica latex*: Purification and characterization. *Phytochemistry*, 117, p.p.154–167.
- Balabanova T., Ivanova M., & Vlaseva R. 2017.** Effect of rennet type and ripening period on chemical properties of Bulgarian white brined cheese. *International Food Research Journal*, 24(6), p.p.2414–2418.
- Ben Amira A., Besbes S., Attia H., Blecker C. 2017.** Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: a review, *International Journal of Food Properties*. 20 (sup1) p.p.76–93.

- Bey N., Debbebi H., Abidi F., Marzouki M. N., & Ben Salah A. 2018.** The non-edible parts of fennel (*Foeniculum vulgare*) as a new milk-clotting protease source. *Industrial Crops and Products*, 112, p.p.181–187.
- Broome M. C., & Limsowtin G. K. Y. 1998.** Milk coagulants. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53, p.p.188-190.
- Cattaneo T.M.P., Nigro F., Messina G., Giangiacomo R. 1994.** Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase. *Milchwissenschaft*, 49, p.p.269-272.
- Chazarra, S., Sidrach, L., López-Molina, D., Rodríguez-López, J. N. 2007.** Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17(12), p.p.1393-1400.
- Clark S., Costello M., Drake M. A., & Bodyfelt F. 2009.** *The Sensory Evaluation of Dairy Products*.
- Colombo M. L., Fernández A., Cimino C. V., Liggieri C., Bruno M., Faro C., Vairo-Cavalli S. 2018.** Miniature cheeses made with blends of chymosin and a vegetable rennet from flowers of *Silybum marianum*: Enzymatic characterization of the flower-coagulant peptidase. *Food Chemistry*, 266, p.p.223–231.
- Dantas Cavalcante A.B. 1995.** Influence des facteurs de composition Sur les propriétés texturales d'un Fromage fondu de "type requeijao". Thèse doctorat, Institut national polytechnique de lorraine. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, 163p.
- Daroit D. J., Correa A. P. F., & Brandelli A., 2009.** Keratinolytic potential of a novel *Bacillus sp* P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, p.p.358-363.
- Da Silva R. R., De Oliveira L. C. G., Juliano M. A., Juliano L., De Oliveira A. H. C., Rosa, J. C., & Cabral, H., 2017.** Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Food Chemistry*, 225, p.p.45-54.
- Duval P., Chatelard-Chauvin C., Gayard C., Rifa E., Bouchard P., Hulin S., Picque D. 2018.** Changes in biochemical and sensory parameters in industrial blue-veined cheeses in different packaging. *International Dairy Journal*, 77, p.p.89–99.
- Eck A., 2006.** Le fromage, de la science à la l'assurance-qualité. 3^{ème} édition, Lavoisier, paris, 890 p.
- Egito A. S., Girardet J. M., Laguna L. E., Poirson C., Mollé D., Miclo L., Gaillard J. L. 2007.** Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. *International Dairy Journal*, 17(7), p.p.816-825.
- El-Tanboly E.S., El-Hofi M., Youssef, B.Y., El-Desoki, W., Ismail, A. 2013.** Utilization of salt whey from Egyptian Ras (Cephalotyre) cheese in microbial milk clotting enzymes production. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 12 (1), p.p. 9–19
- Esposito M., Di Pierro P., Dejonghe W., Mariniello L , Porta R. 2016.** Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. *Food Chemistry*, 204, p.p. 115-121.

Esteves C. L., Lucey J. A., et Pires E. M. 2002. Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin. *International Dairy Journal*, 12(5), p.p.427-434.

Faccia M., Picariello G., Trani A., Loizzo P., Gambacorta G., Lamacchia C., et Di Luccia A. 2012 . Proteolysis of Caciocotta cheese made from goat milk coagulated with caprifig(*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *European Food Research and Technology*, 234(3), p.p.527-533.

Feijoo-Siota L., Rama J. L. R, S´anchez-P´erez A., Villa T.G.2018. Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*.

Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., & McSweeney P. L. H. 2000. Fundamentals of cheese sciences. Gaithersburg, MD, USA: Aspen Publication.

Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., McSweeney P. L. 2016. Fundamentals of cheese science. New York: Springer.

Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., & McSweeney P. L. H. 2017. Fundamentals of Cheese Science. Science And Technology.

Galán E., Cabezas L., et Fernández-Salguero J. 2012. Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *International Dairy Journal*, 25(2), p.p.92-96.

García V., Rovira S., Boutoial K., Álvarez D., et López M., 2014. A comparison of the use of thistle (*Cynara cardunculus L.*) and artichoke (*Cynara scolymus L.*) aqueous extracts for milk coagulation. *Dairy science & technology*, p.p.1-12.

García-Gómez B., Vázquez-Odériz M. L., Muñoz-Ferreiro N., Romero-Rodríguez M. Á., & Vázquez M. 2019. Interaction between rennet source and transglutaminase in white fresh cheese production: Effect on physicochemical and textural properties.

Garg S.K., Johri B.N., 1994. Rennet: current trends and future research. *Food Rev. Int.* 10, p.p.313–355.

Green M.L., 1977. Review of the progress of dairy science: Milk coagulants *J. of Dairy Res.*44, p.p.159-188.

Grozdanovic M. M., Burazer L., et Gavrovic-Jankulovic M. 2013. Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. *International Dairy Journal*, 32(1), p.p.46-52.

Guinee T. P., Auty M. A. E., & Fenelon M. A. 2000. The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat-induced functional characteristics of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 10,p.p.277-288.

Guinee T.P., Feeney E.P., Fox P.F. 2001. Effect of ripening temperature on low moisture Mozzarella cheese. 2. Texture and functionality. ". Dairy Products Research Centre, Cork ,Irlande.

Guinee T. P., 2016. Cheese: Cheese Rheology. Reference Module in Food Science.

Harboe M., Broe M.L. and Qvist K.B. 2010. The Production, Action and Application of Rennets and Coagulants; In *Technology of Cheesemaking*, 2nd ed. LAW B. A. and TAMIME A.Y. Eds. Wiley-Blackwell: Oxford, UK, p.p.98-129.

Hashim M., Dong M., Iqbal M., Li W., et Chen X. 2011. Ginger protease used as coagulant enhances the proteolysis and sensory quality of Peshawari cheese compared to calf rennet. *Dairy science & technology*, 91(4), p.p.431-440

Hassan F. A. M., El-Gawad M. A., & Enab A. 2013. Flavour Compounds in Cheese. *Research on Precision Instrument and Machinery*, 2 (June), p.p.15–29.

Hayaloglu A. A., Karabulut I. 2013. SPME/GC-MS characterization and comparison of volatiles of eleven varieties of Turkish cheeses. *International Journal of Food Properties*, 16(7), p.p.1630-1653.

Hayaloglu A. A., Karatekin B., & Gurkan H. 2014. Thermal stability of chymosin or microbial coagulant in the manufacture of Malatya, a Halloumi type cheese: Proteolysis, microstructure and functional properties. *International Dairy Journal*, 38(2), p.p.136–144.

Henneberry S., Kelly P. M., Kilcawley K. N., Wilkinson M. G., & Guinee, T. P. 2015. Interactive effects of salt and fat reduction on composition, rheology and functional properties of mozzarella-style cheese. *Dairy Science and Technology*, 95, p.p.613–638.

Huang, X. W., Chen, L. J., Luo, Y. B., Guo, H. Y., & Ren, F. Z., 2011. Purification, characterization, and milk coagulating properties of ginger proteases. *Journal of Dairy Science*, 94(5), p.p.2259–2269.

Iwasawa A., Suzuki-Iwashima A., Iida F., & Shiota M. 2014. Effects of Flavor and Texture on the Desirability of Cheddar Cheese during Ripening. *Food Science and Technology Research*, 20 (1), p.p.23–29.

Jacob M., Jaros D., Rohm H., 2011. Recent advances in milk clotting enzymes, *International Journal of Dairy Technology*, 64 (1) p.p.14-33.

Jacob M., Nöbel S., Jaros D., & Rohm H. 2011. Physical properties of acid milk gels: Acidification rate significantly interacts with cross-linking and heat treatment of milk. *Food Hydrocolloids*, 25(5), p.p.928-934.

Jacob, M., Jaros, D., & Rohm, H. 2011. b Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64, p.p.14–33.

Jaros, D., & Rohm, H., 2017. Rennets: Applied Aspects. Cheese, p.p.53–67.

Katsiari M. C., Alichanidis E., Voutsinas L. P., & Roussis I. G. 2000. Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*, 10(9), p.p.635-646.

Khan R.S., Masud T., 2013. Comparison of buffalo cottage cheese made from aqueous extract of *Withania coagulans* with commercial calf rennet. *International Journal of Dairy Technology*, 66, p.p.396- 401.

Khattab A. R., Guirguis H. A., Tawfik S. M., & Farag M. A., 2019. Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. Trends in *Food Science & Technology*.

Kumar A., Sharma J., Saharab M.R., Singb R., 2005. Extracellular acid protease2 from *Rhizopus oryzae* : purification and characterization. *Elsevier Process Biochemistry*, 40, p.p. 1701-1705.

- Kumar A., Sharma J., Mohanty A.K., Grover S., Batish V.K., 2006.** Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Biochem Molecular Biology*, 145, p.p.108–113.
- Kumar A., Grover S., Batish V.K., 2010.** Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30, p.p.243-258.
- Kumari Narwal, R., Bhushan B., Pal A., Panwar A., & Malhotra S. 2016.** Purification, physico-chemico-kinetic characterization and thermal inactivation thermodynamics of milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422. *LWT - Food Science and Technology*, 65, p.p.652–660
- Lamas E. M., Barros R. M., Balcao V. M., & Malcata F. X. 2001.** Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, p.p.642-652.
- Lanoisellé J.L., 2006.** Rhéologie et qualité des produits alimentaires, p.p.1-70.
- Laxman R. S., Sonawane A. P., More S. V., Rao B. S., Rele M. V., Jogdand V. V., Rao M. B. 2015.** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry*, 40, p.p.3152–3158
- Lemes A. C., Pavón Y., Lazzaroni S., Rozycki S., Brandelli A., & Kalil S. J. 2016.** A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus sp.* P45 applied in cream cheese development. *LWT - Food Science and Technology*, 66, p.p. 217- 224.
- Leite Júnior B.R.C., Tribst A.A.L., Cristianini M. 2015.** Influence of high pressure homogenization on commercial protease from *Rhizomucor miehei*: effects on proteolytic and milk-clotting activities. *LWT - Food Science and Technology*, 63, p.p.739-744.
- Li Z., Scott K., Hemar Y., & Otter D. 2018 a.** Protease activity of enzyme extracts from tamarillo fruit and their specific hydrolysis of bovine caseins. *Food Research International*, 109, p.p.380–386.
- Li Z., Yang Z., Otter D., Rehm C., Li, N., Zhou P., & Hemar Y. 2018 b.** Rheological and structural properties of coagulated milks reconstituted in D 2 O: Comparison between rennet and a tamarillo enzyme (tamarillin). *Food Hydrocolloids*, 79, 170–178.
- Liburdi K., Emiliani Spinelli S., Benucci I., Lombardelli C., & Esti M., 2018.** A preliminary study of continuous milk coagulation using *Cynara cardunculus* flower extract and calf rennet immobilized on magnetic particles. *Food Chemistry* ; 239, p.p.157–164
- Llorente B. E., Brutti C. B., & Caffini N. O., 2004.** Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), p.p. 8182-8189.
- Llorente B. E., David Obregón W., Avilés F. X ., Caffini N. O. , Vairo-Cavalli S., 2014.** Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. *Food Chemistry*, 159 , p.p. 55-63.
- Lo Piero A. R., Puglisi I., & Petrone G. 2002.** Characterization of “lettucine”, a serine like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, p.p.2439-2443.
- Low Y. H., Agboola S., Zhao J., et Lim M. Y. 2006.** Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *International Dairy Journal*, 16 (4), p.p.335-343.

- Macedo I.Q., Faro C.J., Pires E.M., 1993.** Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from Cardoon (*Cynara cardunculus L.*) toward bovine k-casein. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 41, p.p.1536–1540.
- Mahajan R. T., et Chaudhari G. M. 2014.** Plant latex as vegetable source for milk clotting enzymes and their use in cheese preparation. *International Journal*, 2(5), p.p.1173-1181.
- Mandujano-Gonzalez V., Villa-Tanaca L., Anducho-Reyes M.A., Mercado-Flores Y., 2016.** Secreted fungal aspartic proteases: a review. *Rev. Iberoam. Micol.* 33, p.p.76- 82.
- Manzoor A. S., Shabir A. M., Mohd Amir P., 2014.** Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology*, 94, p.p.5-16.
- Mazorra-Manzano, M.A., Moreno-Hernández, J.M., Ramírez-Suarez, J.C., Torres-Llanez d, M.J., González-Córdova, A.F., Vallejo-Córdoba, B., 2013.** Sour Orange *Citrus aurantium L.* flowers: a new vegetable source of milk-clotting proteases. *LWT – Food Science and Technology*.
- McCarthy C. M., Wilkinson M. G., Kelly P. M., & Guinee T. P. 2016.** Effect of salt and fat reduction on proteolysis, rheology and cooking properties of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 56, p.p.74-86.
- McSweeney P. L. H. 2011.** Cheese: Biochemistry of Cheese Ripening. In *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*, p.p. 667-674.
- Melchiorson R. C., Jokumsen V. K., Villadsen J., Israelsen H., & Arnau J. 2002.** The level of pyruvate-formate lyase controls the shift from homolactic to mixed-acid product formation in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), p.p.338- 344.
- Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M., Da Silva, R., 2010.** Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). *Food Chemistry*, 120, p.p.87-93.
- Moschopoulou E.E., Kandarakis I.G., Alichanidis E., Anifantakis E.M., 2006.** Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. *Journal of Dairy Research*, 73, p.p.49–57.
- Narwal, R.K., Bhushan, B., Pal, A., Panwar, A., Malhotra, S., 2016.** Purification, physicochemico-kinetic characterization and thermal inactivation thermodynamics of milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422. *Food Science and Technology*, 65, p.p. 652–660.
- Nouani A., Belhamiche N., Slamani R., Belbraouet S., Fazouane F. and Bellal M.M., 2009.** Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization, *International Journal of Dairy Technology*, 62, 112 p.
- Olson D. W., Van Hekken D. L., Tunick M. H., Soryal K. A., & Zengc S. S. 2007.** Effects of aging on functional properties of caprine milk made into Cheddar- and Colby-like cheeses. *Small Ruminant Research*, 70, p.p.218–227.
- Ordiales E., Martin A., Jose Benito M., Hernandez A., Ruiz-Moyano S., de Guia Cordoba M., 2013.** Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “Torta del Casar” cheese-making. *Food Chemistry*. 133, p.p.227-235.

Ortiz de Apodaca M.J., Amigo L., Ramos M., 1994. Study of the milk-clotting and proteolytic activity of calf rennet, fermentation-produced chymosin, vegetable and microbial coagulants. *Milchwissenschaft* 49, p.p.13-16.

Ozturkoglu-Budak S., Wiebenga A., Bron P. A., & de Vries R. P., 2016. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 237, p.p.17-27.

Park Y. W., Juárez M., Ramos M., et Haenlein G. F. W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1), p.p.88-113.

Patel A. R., Mokashe N. U., Chaudhari D. S., Jadhav A. G., & Patil U. K. 2019. Production optimisation and characterisation of extracellular protease secreted by newly isolated *Bacillus subtilis* AU-2 strain obtained from *Tribolium castaneum* gut. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, p.p.101-122.

Piero A. R. L., Puglisi I., et Petrone G. 2011. Characterization of the purified actinidin as a plant coagulant of bovine milk. *European Food Research and Technology*, 233(3), 517-524.

Prados F., Pino A., et Fernández-Salguero J. (2007). Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* in the accelerated ripening of Manchego cheese. *International journal of food science & technology*, 42(5), p.p.556-561.

Rajagopalan A., Sukumaran B.O., 2018. Three phase partitioning to concentrate milk clotting proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br and its characterization, *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, p.p. 279- 288.

Rincón A. A., Pino V., Fresno M. R., Jiménez-Abizanda A. I., Álvarez S., Ayala J. H., & Afonso A. M. 2017. Influence of vegetable coagulant and ripening time on the lipolytic and sensory profile of cheeses made with raw goat milk from Canary breeds. *Food Science and Technology International*, 23(3), p.p.254–264.

Robinson R. K., 1998. Coagulants and Precipitants ; In « Cheesemaking Practice » Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Roseiro L. B., Barbosa M., Ames J. M., & Wilbey R. A., 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56, p.p.76–85.

Sales-Gomes M., Lima-Costa M.E., 2008. Immobilization of endoproteases from crude extract of *Cynara cardunculus* L. flowers. *Food Science and Technology*, 14, p.p.271-276.

Salehi M., Aghamaali M. R., Sajedi R. H., Asghari S. M., & Jorjani E., 2017. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, p.p.847-854.

Sampaio P.N., Pais M.S., Fonseca L.P., 2014. A novel fed-batch based strategy for enhancing cell-density and recombinant cyprosin B production in bioreactors. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 37, p.p.2515- 2517.

Sarmento A. C., Lopes H., Oliveira C. S., Vitorino R., Samyn B., Sergeant K., Barros M. T., 2009. Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus L.* *Planta*, 230, p.p.429-439.

- Selin A., Demet E., Çağım A.Ç., Hasan V., Asliye K., Mehmet K. 2018.** Effect of *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) rennet on the texture, rheology, and sensory properties of white cheese. *Food Sciences and Nutrition*, 6(4), p.p.1100-1108.
- Shah, M.A., Mir S.A., Paray M.A., 2013.** Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review, *Dairy Science and Technology*, 94 (1) , p.p.5-16.
- Shah M. A., & Mir S. A. 2014.** Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking : A review, Vols. p.p.5-16.
- Shi, Y., Prabakusuma, A.S., Zhao, Q., Wang, X., Huang, A., 2019.** Proteomic analysis of *Moringa oleifera* Lam. leaf extract provides insights into milk-clotting proteases, *LWT - Food Science and Technology*.
- Sidrach L., García-Cánovas F., Tudela J., & Rodríguez-López J. N., 2005.** Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): Enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, 66 (1), p.p.41-49.
- Smith J.L, Billings G.E. and Yada R.Y., 1991.** Chemical modification of amino groups in Mucor miehei Aspartyl proteinase, porcine pepsin and chymosin. 1. Structure and function. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, p.p.2009–2016.
- Sirtori, L. R., Cladera-Olivera, F., Lorenzini, D. M., Tsai, S. M., & Brandelli, A. 2006.** Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 52, p.p.357-363.
- Sousa M. J., & Malcata F. X. 1998.** Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extract from flowers of *Cynara cardunculus* L. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, p.p.305-314.
- Sousa M. J. and Malcata F. X. 2002.** Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) *in vitro* and during ripening of cheese from several milk species. *Lait* 82 : p.p.151-170.
- Sumantha A., Larroche C., Pandey A. 2006.** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade. *Food technology biotechnology*. P.p.211–220.
- Van Rooijen G., Glenn K.R., Shen Y., Boothe J. 2008.** Commercial production of chymosin in plants, Google Patents.
- Vishwanatha K.S., Rao, A.G.A., Singh S.A., 2009.** Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114, p.p.402-407
- Vioque M., Gomez R., Sanchez E., Mata C., Tajada L. et Fernandez-Salguero J., 2000.** Chemical and microbiological characteristics of Ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *cynaracardunculus* and *cynarahumilis* coagulants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, P.P.451-456.
- Visser J., 1991.** Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese. *International Dairy Federation. Bulletin*. 268, p.p.49–61.

- Watkinson P., Coker C., Crawford R., Dodds C., Johnston K., McKenna A. 2001.** Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal*, 11, p.p.455-464.
- Wehaidy H. R., Abdel-Naby M. A., Shousha W. G., Elmallah M. I. Y., & Shawky M. M. 2018.** Improving the catalytic, kinetic and thermodynamic properties of *Bacillus subtilis* KU710517 milk clotting enzyme via conjugation with polyethylene glycol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, p.p.296–301.
- Wu F. C., Chang C.W., Shih L.L., 2013.** Optimization of the production and characterization of milk-clotting enzymes by *Bacillus subtilis natto*. *Springer* 2, p.p.33-42.
- Yamashita T., Higashi S., Higashi T., Machida H., Iwasaki S., Nishiyama M. and Beppu T., 1994.** Mutation of a fungal aspartic protease, *Mucor pusillus rennin*, to decrease thermostability for use as a milk coagulant. *Journal of Biotechnology*, 32, p.p.17–28.
- Yegin S., Fernandez-Lahore M., Jose Gama Salgado A., Guvenc U., Goksungur Y., Tari C., 2011.** Aspartic proteinases from *Mucor spp.* in cheese manufacturing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, p.p.949-960.
- Yegin S., & Dekker P. 2013.** Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: Structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Science & Technology*, 93(6), p.p.565–594.
- Zhang, Y., Xia, Y., Ding, Z., H. Lai, P. F., Wang, G., Xiong, Z., ... Ai, L. , 2019.** Purification and characteristics of a new milk-clotting enzyme from *Bacillus licheniformis* BL312. *LWT*, 113, 108276.
- Zhao J., Chen S., Agboola S.O., 2003.** Effect of starter culture on the biochemical and sensory properties of ovine cheese manufactured with a plant coagulant. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58 (2), 219p.

Chapitre I : Evaluation des propriétés rhéologiques et sensorielles d'un fromage à pâte pressée non cuite fabriqué à base d'une présure de remplacement d'origine végétale (*Cynara scolymus*).

Introduction

La carence en présure sur le marché mondial a conduit à une augmentation de son prix. Parallèlement, la production de fromage a progressivement augmenté au cours des années. Cette situation a conduit à la recherche d'autres préparations enzymatiques alternatives d'origines diverses, pouvant coaguler le lait de façon analogue à la présure. Néanmoins, une attention croissante a été dirigée vers des extraits naturels d'origine végétale comme alternative.

Matériel et méthodes

I- Matériel végétal

1. Matière première employée

La cynarase a été extraite à partir des capitules frais d'artichaut (*Cynara scolymus*) (**Figure n°8**). Les capitules de *Cynara scolymus* ont été récoltés vers la fin du mois de février. L'artichaut est un légume très cultivé durant la saison hivernale, très consommé surtout dans le nord algérien.



Figure n°8: Coupe schématique d'un capitule.

2. Obtention et prétraitement des fleurs d'artichaut

Les capitules de *Cynara scolymus* (fleurs d'artichaut) récoltées en mois de février au niveau de la région de Boudouaou (Boumerdes, Algérie). Séchées à l'air libre pendant 3 semaines sur

une toile n'absorbant pas d'humidité selon la méthode décrite par plusieurs auteurs dont **Martins *et al.* (1996)**, ensuite congelés à -18°C . Ce procédé permet aux échantillons de conserver pendant longtemps leurs activités. L'avantage de ce déchet est apparent, les fleurs se trouvant dans le capitule peuvent être récupérées en grande quantité dans les centres de restauration collective ou mieux dans les conserveries d'artichaut et constituent de ce fait des déchets d'épluchage du légume. La variété employée dans notre étude est dénommée, variété : « violet ».

2.1.Extraction de l'enzyme brut

Pour extraire le système enzymatique des fleurs sèches d'artichaut, plusieurs types d'extractions ont été appliqués et de nombreux protocoles ont été décrits. Le protocole, appliqué dans notre travail est celui décrit par (**Freni *et al.*, 2001**). L'extrait brut a été préparé par broyage, à l'aide d'un mortier, d'un échantillon de fleurs (10g) pris au hasard.

Ensuite la macération a été faite dans 50 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M (pH 5,4), (**Annexe I.1**) additionné de 0,2% d'acide borique afin d'éviter ultérieurement toute prolifération de microorganismes. Après macération, une centrifugation à 5000 trs/min pendant 15 min a été réalisée, le surnageant qui en résulte a été filtré (papier Wattman n°1) et l'extrait brut de fleurs d'artichaut ainsi obtenu est utilisé tel quel (Extrait enzymatique brut ou EEB) ou bien purifié pour des considérations analytiques. Le procédé est décrit dans le diagramme de la **Figure n°9**.



Caractère apparent de l'extrait enzymatique brut.

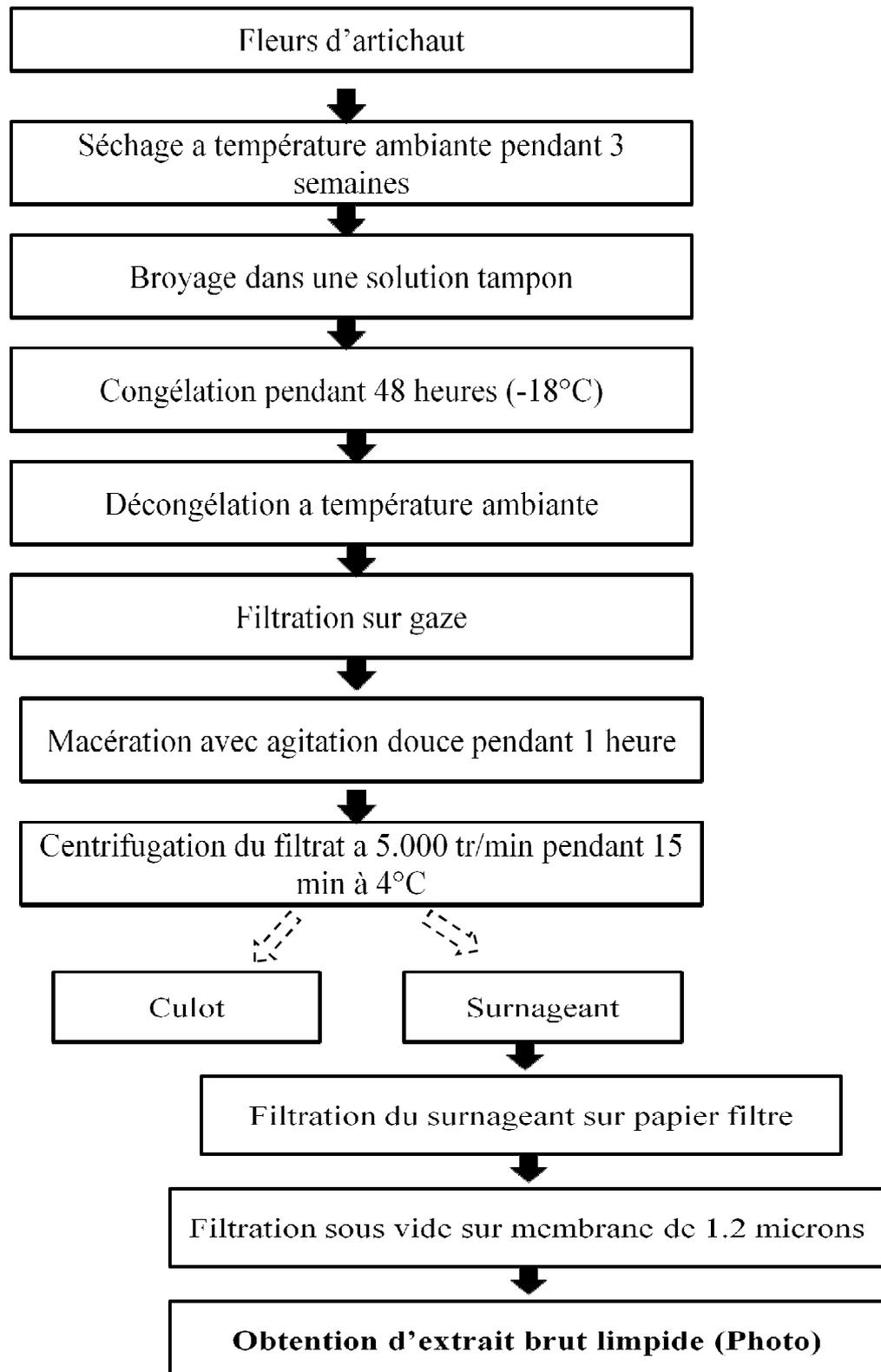


Figure n°9: Etapes d'obtention de l'extrait enzymatique brut (*Cynara scolymus*) (Photo)

2.2. Détermination de l'azote totale de l'EEB

Principe

La méthode de Kjeldhal est appliquée pour déterminer la quantité de protéine brute ou azote total. C'est la méthode de référence pour la détermination de l'azote contenu dans un produit. Elle s'effectue en trois étapes : la minéralisation (digestion), la distillation et le titrage.

La minéralisation vise à convertir la totalité de l'azote organique en ions ammonium (NH_4^+). Les molécules organiques mises en présence d'un bon rapport acide sulfurique concentré (H_2SO_4) / sulfate de potassium (K_2SO_4) catalysé par du sulfate de cuivre (CuSO_4), sont décomposées par oxydation pour donner principalement du CO_2 et de l'eau. L'azote organique quant à lui est converti en sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. On ajoute un excès d'hydroxyde de sodium (NaOH) au digestat refroidi pour permettre la transformation de l'azote, sous forme de sulfate d'ammonium, en ammoniac (NH_3). Ce dernier est distillé dans un excédent d'acide borique et déterminé par titrage avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl). L'essai a été réalisé à l'aide d'un distillateur d'azote type GERHARDT.

La procédure de dosage des protéines par la méthode de Kjeldahl est détaillée en **Annexe I.2**.

2.3. Rendement d'extraction

➤ Par rapport à l'extrait brut

Le rendement d'extraction en protéines totales de l'extrait brut de fleurs d'artichaut est calculé en pourcentage à partir du taux de protéines totales de l'extrait brut par rapport à la masse nette de la matière première employée (**Edward ,1986**).

$$\text{Rendement} = \text{MPE} / \text{MmP} \times 100$$

MPE : Masse de protéines de l'extrait enzymatique brut.

MmP : Masse de la matière première employée.

II- Analyse de l'extrait enzymatique brut

1. Mesure de l'activité coagulante

L'activité de coagulation du lait a été mesurée selon le protocole décrit par **Shieh et al. (2009)** avec des légères modifications. La poudre de lait écrémé a été reconstituée en dissolvant 12.5g dans 100 de 0,5g/L de solution de CaCl_2 (pH 6,5) (substrat de Berridge) (**Berridge, 1945**). Le test de coagulation a été effectué en mélangeant 10ml de substrat à 1ml d'extrait enzymatique. Elle est basée sur l'évaluation visuelle de l'apparition des premiers flocons. L'activité coagulante est exprimée en terme d'unité de Soxhlet (US). 1 US est défini comme

étant la quantité d'enzyme coagulant 1ml d'une solution contenant 0,12g de poudre de lait écrémé et 0,11g CaCl₂ en 40minutes à 35°C. L'activité coagulante a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$US=2400 \times D / T \text{ ou}$$

T : temps(s) de coagulation ;
D : dilution de l'extrait brut.

2. Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode rapportée par **Silva et al. (2014)** et **Shieh et al. (2009)**. Le mélange réactionnel est composé de 0,4 ml de tampon acétate 0,2 mol/L à pH 5,5 et 0,2 ml de l'enzyme brute. La réaction s'est produite dans un bain à 35°C et, au bout de 30min, la réaction a été arrêtée en ajoutant 1ml d'acide trichloracétique à 10% (TCA). 2ml du filtrat ont été ajoutés à 5ml de solution de NaOH (0,28N) et 1,5ml de réactif phénolique (solution de Folin-Ciocalteu phénol : eau = 1 : 2). Après avoir maintenu le mélange à 35°C pendant 15min, on a mesuré la densité optique (DO) à 660nm. L'activité protéolytique a été exprimée en unités correspondant à la DO de 660nm (*Spectrophotomètre UV-Visible, modèle V560, Shimadzu, Japon*). Le rapport (R) a été déterminé en divisant l'activité coagulante par l'activité protéolytique, par la formule :

$$R= MCA(SU) / PA (POD660nm)$$

3. Détermination de l'indice AC/AP

Selon **Abel-Fattah et EL-Hawwary (1974)**, le rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique (AC/AP) pour les préparations enzymatiques représente un indice d'appréciation de la qualité de ces présures de remplacement par rapport à la présure de référence. Sa mesure permet de déterminer l'aptitude d'une préparation enzymatique à coaguler le lait au même titre que la présure. C'est dans cet esprit que nous avons déterminé ce rapport qui correspond à la mesure des deux activités décrites précédemment. Elle est définie comme étant le rapport entre l'activité coagulante et l'activité protéolytique.

4. Etude des effecteurs

➤ Principe

L'effet des effecteurs sur l'activité coagulante des extraits bruts filtrés est rapporté par la méthode décrite par **He et al. (2010)** ; **Majumder et al. (2015)**. Différents inhibiteurs de protéases, principalement l'inhibiteur des métalloprotéase (EDTA à 5mM), l'inhibiteur des

aspartyl protéases (Pepstatine A à 10 et 20 μ M) et le (2-Mercaptoethanol à 5mM) inhibiteurs des cysteïl protéases, sont ajoutés séparément dans l'extrait enzymatique. L'effet de l'inhibiteur sur l'activité enzymatique représente l'activité résiduelle relative rapportée à l'activité initiale de l'enzyme sans effet de l'inhibiteur qui représente 100% d'activité.

➤ **Préparation des inhibiteurs**

• **Pepstatine A**

Cet effecteur a un effet d'inhibiteur sur les protéases si en sa présence l'activité coagulante est nulle ou très faible. On conclue alors que la protéase fait partie du groupe des aspartyl protéases proteases à aspartate.

• **EDTA**

C'est le même principe que la pepstatine A. Dans ce cas, on déduit que la protéase fait partie du groupe des Metalloprotéases.

• **2-Mercaptoethanol**

Il permet d'identifier les protéases à cystéine.

III- Purification des extraits enzymatiques par chromatographie d'exclusion moléculaire

La purification a porté sur deux types de colonnes de séparation dont le but diffère selon le protocole établi et l'objectif de la mesure.

1. Purification sur colonne analytique Sephacryl S-200

Afin d'avoir une meilleure appréciation de la purification et une bonne résolution du profil d'éluion des extraits, le gel utilisé est le Sephacryl S-200. En effet, ce dernier est un gel à haute résolution. Il est formé d'un mélange composite de dextran et d'acrylamide. Il est stable entre pH 3 et 11 et peut être autoclavé à pH 7. Son domaine de séparation des protéines, ceux dont les masses moléculaires comprises entre 5.000 à 250.000 Da.

2. Purification sur colonne semi préparative sur gel Séphadex G-50

Les extraits enzymatiques bruts sont soumis à une chromatographie d'exclusion moléculaire sur colonne semi préparative sur gel Sephadex G-50. L'emploi de cette colonne permet d'une part d'obtenir un volume d'extrait enzymatique purifié appréciable afin de réaliser soit des essais technologiques ou des essais analytiques menés sur des enzymes purifiées. D'autre part, cette purification permet de décolorer efficacement des échantillons colorés à l'instar des extraits d'artichaut noircis par un phénomène de brunissement enzymatique lors des extractions.

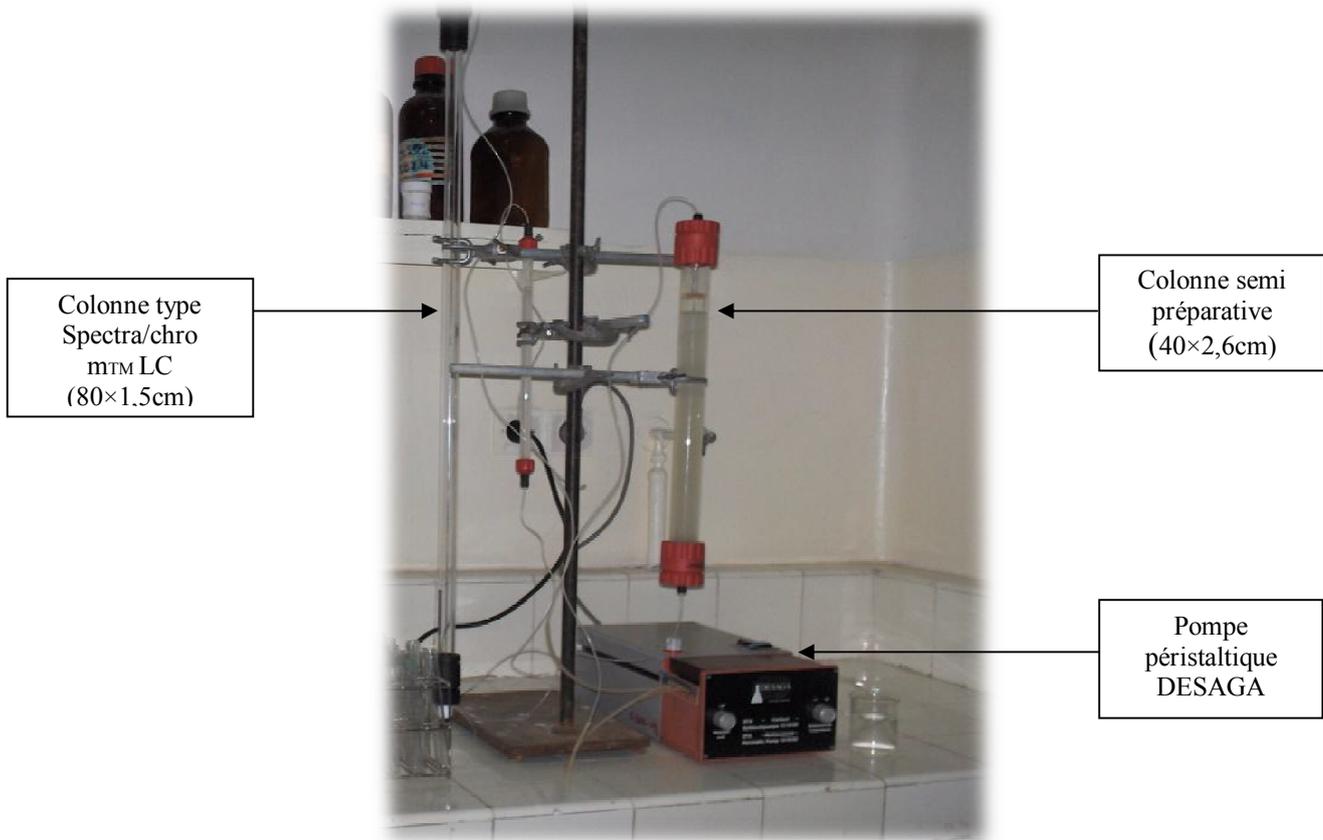


Figure n°10: Dispositif de chromatographie d'exclusion moléculaire.

3. Analyse des extrais purifiés : Méthodes analytiques

3.1. Détermination du taux de protéines enzymatiques (Méthode de Lowry).

Principe

Le dosage des protéines dans les solutions enzymatiques est effectué par la méthode de **Lowry (1951)**. La densité optique est mesurée par spectrophotométrie à 660 nm. Le taux de protéines est déterminé à partir d'une courbe étalon d'une solution de *Bovin serum albumin* (BSA) à 200 μ g/ml (**Annexe I.3**).

3.2. Mesure de l'activité coagulante

(Voir méthode de mesure décrite précédemment).

3.3. Rendement enzymatique

On détermine la quantité de protéines enzymatiques contenue dans un volume d'extrait enzymatique brut puis dans une masse donnée de capitules exprimé en % .

4. Electrophorèse SDS PAGE et détermination du poids moléculaire

➤ Principe

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la séparation des protéines en fonction de leurs charges et de leurs poids moléculaires (**Annexe I.4**).

Le S.D.S. ($\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{11} \text{SO}_3 \text{Na}^+$) est un agent dénaturant qui se fixe sur les protéines leur conférant une charge négative. De ce fait, la mobilité électrophorétique du complexe S.D.S protéines dépendra du poids moléculaire.

Il existe une relation de linéarité entre le logarithme de masse moléculaire d'une protéine et sa mobilité électrophorétique au sein d'un gel. La détermination de la masse moléculaire des échantillons est effectuée en utilisant une courbe étalon où $\text{Log}(\text{PM}) = f(\text{Rf})$.

Rf = Distance parcourue par la protéine / Distance de migration de bleu de bromophénol

La fraction active obtenue à partir d'un gel filtration sur colonne semi préparative remplie de gel Sephadex G-50 a été congelée et lyophilisée (*Cf. chapitre purification par chromatographie d'exclusion moléculaire*) pour une électrophorèse selon Laemmli (1970) afin de vérifier l'homogénéité et la pureté de l'enzyme d'une part et l'identification possible de formes de cynarases s'il y a lieu d'autre part suivi de leur poids moléculaire. Les différents échantillons et marqueurs, sont séparés sur un gel de polyacrylamide formé par un gel de séparation à 12% et un gel de concentration à 5% (**Annexe I.4**). La migration électrophorétique est obtenue grâce à un système d'électrophorèse 'Max Fill Bioblock Scientific'. Le kit de protéines marqueurs de poids moléculaire (26-180 kDa) a été utilisé à des fins de comparaison. (Standard protéique : Alpha 2 macroglobuline from equine serum : 180 kDa ; β -galactosidase from *E.Coli* : 116 kDa ; Lactoferrin from human milk : 90 kDa ; Pyruvate kinase (rabbit muscle) : 58 kDa ; Fumarase (porcine heart) 48.5 kDa ; Lactic déhydrogénase (rabbit muscle) 36.5 kDa ; Triosephosphate isomérase 26 kDa).

5. Caractérisation des extraits coagulants purifiés

Afin de caractériser l'extrait enzymatique purifié, nous avons déterminé les conditions optimales d'activité coagulante en faisant varier les paramètres suivants : température, pH, concentration en CaCl_2 du lait et la concentration en enzyme.

La mesure de l'activité sous ces différents paramètres est déterminée en observant le temps de coagulation du lait en faisant varier les valeurs du paramètre étudié.

Les différents paramètres : volume, pH, température, ainsi que la concentration en CaCl_2 du lait sont fixés selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante (température 35°C , pH 6,4, concentration en CaCl_2 0,01 M et concentration en enzyme).

L'activité optimale est exprimée en pourcentage (activité relative) par rapport à la plus forte activité obtenue (temps de coagulation le plus court).

Notons que nous avons comparé notre extrait enzymatique purifié à la protéase microbienne : *Aspergillus niger* var. *awamori*.

Pour l'étude, la concentration des solutions enzymatiques est ajustée de façon à obtenir un temps de coagulation de grandeur comparable compris entre 5 et 10mn selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante des extraits enzymatiques, sauf pour l'étude de l'activité coagulante en fonction de la concentration, où la concentration en enzyme varie alors que les autres paramètres sont fixés selon les conditions standard.

- **Influence du pH du lait**

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

- **Influence de la température**

La température optimale de coagulation est évaluée en mesurant le temps le plus court de coagulation du lait avec une variation allant de 30 à 90°C avec un intervalle de 10°C . Les autres paramètres sont fixés selon les conditions standards.

- **Influence de la concentration en CaCl_2**

La concentration en CaCl_2 favorisant l'activité coagulante est déterminée en observant le temps le plus court de coagulation additionnée de CaCl_2 à différentes concentrations.

La concentration en CaCl_2 varie de 0,01 M à 0,08 M avec un intervalle de 0,01M. Les autres paramètres restant fixes selon les conditions standards.

- **Influence de la concentration en enzyme**

La concentration optimale en enzyme des extraits coagulants dans la réaction de coagulation est déterminée en observant le temps le plus court de coagulation du lait en ajoutant la solution enzymatique à différentes volumes allant de 0,5 à 5 ml avec un intervalle de 0,5ml.

IV- Essai de fabrication de fromage à pâte pressée non cuite

1. Qualité du lait de vache : Indices physicochimiques

• Détermination de la densité

Principe

La densité d'un liquide est le rapport entre la masse volumique de ce liquide et celle d'un même volume d'eau à 20°C. Elle est réalisée au moyen d'un thermo-lactodensimètre (**Annexe I.5**).

• Détermination de l'acidité

Principe

La détermination de l'acidité du lait est basée sur la neutralisation de l'acidité lactique dans le lait par une solution d'hydroxyde de sodium en présence de phénolphthaléine comme indicateur coloré (**Annexe I.5**).

• Détermination de la matière grasse (méthode acido-butyrométrique de Gerber)

Principe

Cette méthode est basée sur la dissolution des composants du lait par l'acide sulfurique à l'exception de la matière grasse qui se sépare sous l'influence de la centrifugation et grâce à l'adjonction d'une petite quantité d'alcool iso-amylique permettant la séparation de la phase aqueuse et la phase lipidique (**Annexe I.5**).

• Détermination de l'extrait sec totale (la matière sèche totale)

L'extrait sec total (EST) représente l'ensemble des composants du lait qui forment la matière sèche du lait et qui résulte de la dessiccation du lait.

Principe

L'extrait sec total (évaporation ou élimination de l'humidité du lait) est mesuré au moyen d'un dessiccateur (type précisa HA 300), équipé d'un système de chauffage avec deux lampes à rayonnement infrarouge et d'un clavier permettant la programmation des paramètres d'analyse (**Annexe I.5**).

• CPG de la matière grasse du lait

Préparation des esters méthyliques

- Prélever 1 ml d'hexane contenant 50 à 100 µg de matière grasse pure du lait et le mettre dans un tube à vis.
- Ajouter 200 µl de NaOH 2N dans du méthanol, bien boucher. Agiter 10 secondes ;
- Porter au bain marie à 50°C pendant 20 secondes. Agiter. Laisser refroidir ;

- Ajouter 200 µl d'HCl méthanolique 2N afin d'éviter l'introduction d'agent alcalin dans la colonne ;
- Agiter, laisser décanter et recueillir la couche supérieure (phase hexanoïque) qui contient les esters méthyliques.

- **Conditions opératoires de la CPG**

Les conditions de chromatographie en phase gazeuse doivent permettre de séparer efficacement les esters méthyliques des acides C₄:0 à C₂₂:n. L'analyse été réalisée à l'aide d'un chromatographe de type *Chrompack CP 9002* dans les conditions opératoires suivantes :

- Gaz vecteur : N₂ ;
- Colonne capillaire type : DB23 (50% Cyanopropyl) ;
- Température de l'injecteur : 250°C ;
- Température de détecteur : 280°C.

2. Obtention et dosage des Caséines entières

L'extraction des caséines entières est réalisée sur des laits de vache. Le lait chauffé à 32°C est dégraissé par centrifugation à 3000g à température ambiante pendant 30mn et les caséines entières sont isolées par précipitation isoélectrique à pH 4,6 avec de l'acide chlorhydrique (HCl) 1 molaire. Le précipité obtenu est lavé 3 fois avec de l'eau distillée, solubilisé à pH 7 à l'aide d'une solution de NaOH 1M puis dialysé à froid contre de l'eau distillée à froid (EGITO *et al.*, 2007).

Détermination du taux de caséines solubilisées

La teneur de l'azote total de la solution de caséines solubilisées a été déterminée par la méthode de Kjeldhal (*Cf. Matériel et méthode /Dosage des protéines totales par la méthode de Kjeldhall*) sur une prise aliquote de 5ml.

3. Préparation du fromage

Dans cet essai notre but est d'étudier les aptitudes à la coagulation du lait de l'enzyme extraite et les propriétés rhéologiques des fromages préparés, par comparaison avec la présure commerciale (chymosine de la souche d'*Aspergillus niger*).

3.1. Procédé de fabrication

L'essai de fabrication comprend en deux essais : le premier est réalisé avec l'extrait enzymatique coagulant brut de l'artichaut, le second avec la présure commerciale provenant de la laiterie LFB de Boudouaou.

Ces essais ont été réalisés au niveau du laboratoire suivant le procédé pratiqué au niveau de l'unité LFB de Boudouaou, en respectant les conditions de fabrication industrielle ainsi que l'emploi des mêmes ingrédients (**figure n°11**).

a- Traitement du lait

La quantité de lait utilisée pour la fabrication est de 10 litres (le lait provient d'une ferme de Boudouaou). Le lait doit être de très bonne qualité physicochimique à savoir :

- ✚ Le lait de vache cru est à 36 g/l de matière grasse avec un extrait sec total de 126 g/l.
- ✚ Ajouter du CaCl₂ à raison de 1g/l. Pour s'assurer de la qualité de la matière grasse du lait, une chromatographie en phase gazeuse doit être réalisée pour déterminer la valeur du marqueur de qualité sur le profil chromatographique à savoir l'acide linoléique C18 :2.
- ✚ La pasteurisation est réalisée dans un bain marie à 65 °C pendant 30 mn.
- ✚ Cette pasteurisation va permettre de réduire la flore banale et d'éliminer la flore pathogène.
- ✚ Le lait est ensuite refroidi à 38°C.

b- Ensemencement du lait traité

La maturation du lait est réalisée par ajout de ferments lactiques mésophiles.

Les ferments ou levains lactiques sont des cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques qui se multiplient dans le lait et dans les fromages, assurent deux fonctions essentielles :

- ✓ Abaisser le pH du milieu en transformant le lactose en acide lactique et permettre une bonne action des aspartyl protéases.
- ✓ Contribuer aux caractères organoleptiques des fromages pendant l'affinage en libérant des systèmes enzymatiques et des arômes.

Les ferments proviennent de l'unité LFB de Boudouaou. Ils sont ajoutés par ensemencement direct à raison de 100 mg/10 litres de lait, suivi d'un brassage jusqu'à dissolution complète des ferments.

c- Emprésurage

Deux petites cuves servant à l'essai sont remplies avec du laitensemencé.

Les cuves sont emprésurées séparément, l'une avec l'extrait enzymatique coagulant brut de l'artichaut et l'autre avec la présure commerciale.

La température du lait est ajustée à 38°C, et la coagulation complète dure environ 40 mn. La concentration des extraits enzymatiques est préparée de façon à donner un temps de coagulation égal ou le plus proche l'un de l'autre, et cela en se basant sur la force coagulante de chaque enzymes: pour l'extrait brut de l'artichaut, la concentration est de 12ml d'EEB /l de lait alors que pour la présure commerciale étant de 20 mg /l de lait.

d- Découpage et brassage du caillé

✚ Après la coagulation complète du lait, le caillé est découpé à l'aide d'un couteau et brassé à l'aide d'un fouet.

✚ Ensuite le caillé est laissé au repos pendant environ 20 mn.

Ces opérations qui donnent au caillé la forme de fromage et a pour but également d'éliminer le reste de lactosérum inter-granulaire. Il permet au lactosérum de s'échapper par auto pression exercée par le poids du caillé.

✚ Préparation des moules tapissés de gazes.

✚ Récupérer le gâteau du caillé.

✚ Découpé ce gâteau en morceaux de même poids et déposer chaque morceau dans le moule.

✚ Pressage à une pression d'environ 5 à 6 bars pendant 4 heures.

C'est une étape qui complète la coagulation, son but est de régler la teneur en eau du fromage, en vue d'obtenir un substrat qui sera soumis aux actions enzymatiques au moment de l'affinage (**Lenoir et al., 1971**).

e- Salage

Après le démoulage, on place les pièces du fromage dans un bain de saumure à 20° Baumé soit environ 250 g de Na Cl /L d'eau distillée. La température du bain est d'environ 15°C. Le saumurage dure 3 heures.

f- Affinage

L'affinage est l'opération la plus importante, c'est une opération qui consiste à la maturation du fromage par voie biologique sous l'action des enzymes, c'est un résultat global de phénomènes variés (glycolyse, lipolyse, protéolyse...) dont la combinaison fixe les caractères organoleptiques du fromage. (**Lenoir et al.,1971**). Cette opération est réalisée dans une enceinte climatisée de 12 à 14°C et une humidité de 85 - 95%, avec des retournements chaque jour. La durée d'affinage est de 4 semaines pour ce type de pâte.

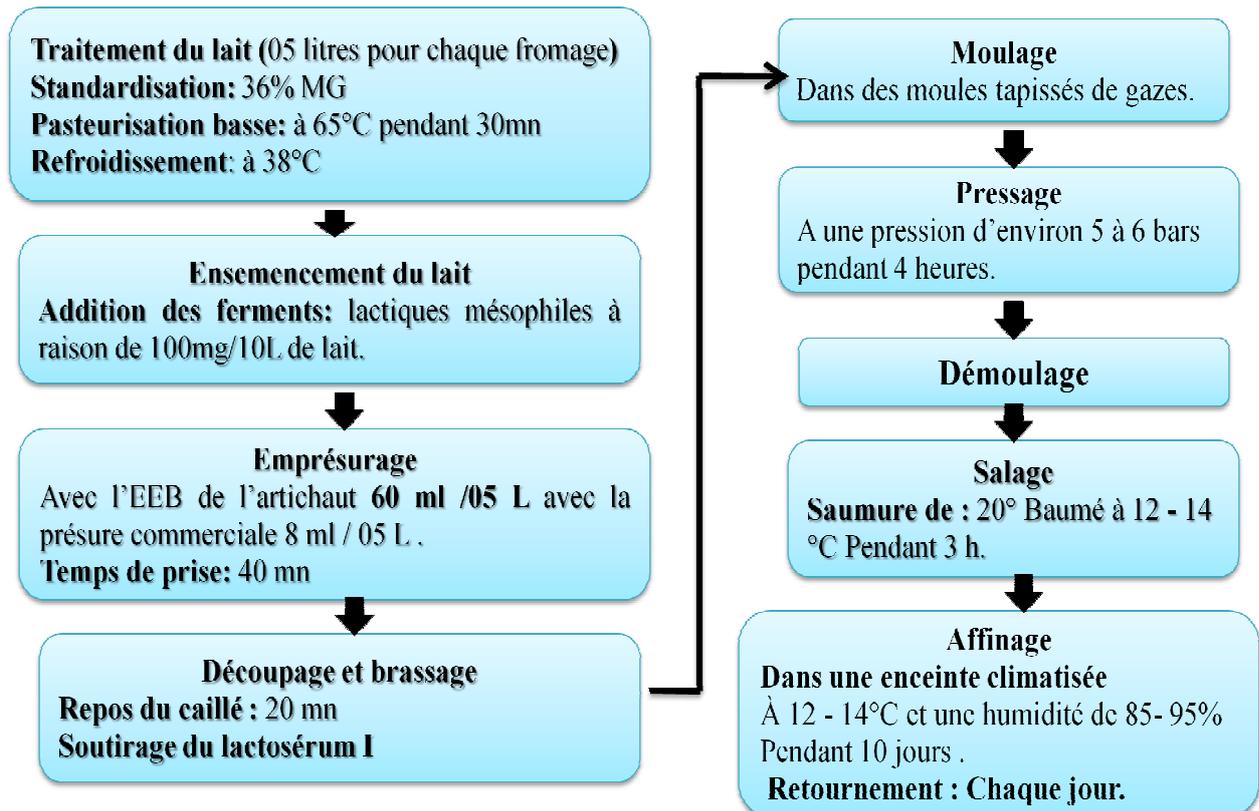


Figure n°11: Diagramme de la fabrication d'un fromage à pâte pressée non cuite à l'échelle expérimentale.

4. Rhéologie du fromage

4.1. Viscosité et contrainte

Pour déterminer le comportement rhéologique des différents échantillons de fromage à différentes phases de préparation (lait emprésuré, gel présure, pâte pressée), un viscosimètre «Thermo HAAKE VT 550 » de l'unité de recherche en matériaux (FSI) (**Figure n°12**) avec une *géométrie plan plan* a été utilisé.

Les essais consistent en une comparaison du comportement vis à vis de la viscosité et de la contrainte des échantillons expérimentaux à base d'extrait enzymatique de l'artichaut à ceux d'une référence à base de présure commerciale.

L'appareil, est un viscosimètre qui contrôle et caractérise des échantillons visqueux en mode de rotation déterminant leur comportement rhéologique telle que la viscosité et la contrainte. La technique la plus utilisée avec ce type de viscosimètre, consiste à imposer une vitesse de cisaillement et calculer la contrainte de cisaillement et la viscosité apparente.

L'angle de cône Ψ (**Figure n°13**) est très faible ($\leq 4^\circ$) pour obtenir un taux de cisaillement vertical.

Un régulateur de température de type (HAAKE DC 30) est utilisé dans le but de maintenir la température choisie de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durant toute la durée de l'analyse.

➤ **Mode de mesure**

Un échantillon ne dépassant pas un volume de 0.1 cm^3 est déposé à l'aide d'une fine spatule, sur la surface plan du dispositif de mesure. La géométrie supérieure tourne (Cône) à une faible distance, l'échantillon en faible quantité remplissant le volume de mesure. Le résultat traité à l'aide d'un logiciel *Rheowin- logiciel* facultatif de HAAKE, est illustré par un graphe soit de la viscosité ou de la contrainte en fonction du temps.

Les constantes de mesure du dispositif en fonction des matériaux d'essai (Fromage à l'état liquide, gel ou pâte pressée) sont les suivantes (en mode **PK1 – 1°**) (**Document HAAKE, Mode d'emploi**).

1. Cône :

- ❖ Rayon R (mm) : **14**
- ❖ Angle 10^{-2} rad: **1,74**

2. Volume de remplissage (cm^3) : 0,1

3. Constantes :

- ❖ f (Pa/Ncm) : **1740,0**
- ❖ M (min/s) : **6**

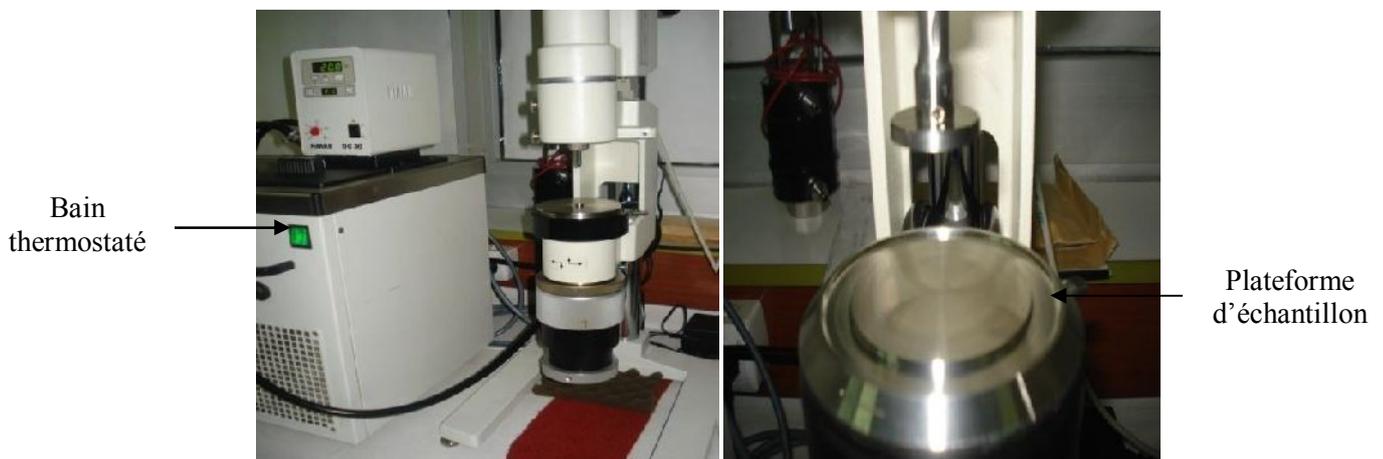


Figure n°12: Photo du viscosimètre « Thermo HAAKE VT550 » et du dispositif de mesure sur géométrie plan plan (photo originale unité matériaux FT,UMBB).

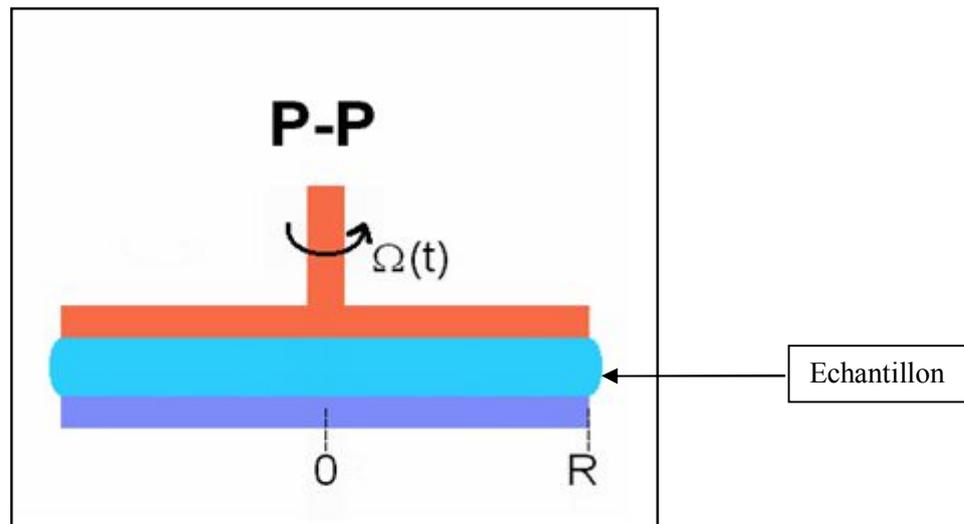


Figure n°13: Schéma de la géométrie plan plan du dispositif de mesure de la rhéologie (viscosité et contrainte) des échantillons de fromage a différentes phases de préparation.

5. Mesure du potentiel Zeta des laits emprésurés

La fabrication de la quasi totalité des fromages repose sur une étape initiale de coagulation mixte du lait résultant de l'action d'une enzyme protéolytique. La coagulation du lait entraîne la réduction du potentiel zêta et l'altération structurale de l'enveloppe protéique des micelles de caséines.

L'objectif de la mesure du potentiel Zeta rejoint cette brève introduction et montrer dans quelle mesure la variation du potentiel Zeta des laits emprésurés est influencée par l'emploi des présures de remplacement (présure végétale) comparativement à une présure commerciale.

5.1. Mesure du potentiel

L'essai de mesure du potentiel zêta a été réalisé à l'aide d'un potentiel zêta (type *Zetamètre 2000*) sur une solution de lait emprésuré à une concentration de 0,1% dans de l'eau distillée. Un temps d'emprésurage identique de 5 mn est pris pour les 2 échantillons.



Figure n°14: Appareil de mesure du potentiel zêta (type *Zetamètre 2000*) des échantillons de laits emprésurés.

V- Analyse sensorielle : test de dégustation des fromages

Selon la norme française **NF ISO 5492**, l'analyse sensorielle est définie comme étant :

« L'examen des propriétés organoleptiques d'un produit par les organes des sens ». De part ces cinq sens (vue, ouïe, odorat, goût, toucher) l'être humain est devenu l'instrument de mesure des méthodes d'analyse sensorielle pour caractériser et évaluer des produits.

Cette analyse nous permet d'évaluer la qualité organoleptique du produit fini (Fromage expérimental à base d'extraits enzymatiques des capitules de l'artichaut et le fromage référence à base de présure commerciale). La méthode d'évaluation choisie est basée sur l'exploitation systématique des réactions d'un jury de dégustation.

1. Conduite du test de dégustation

Le test de dégustation est mené sur 2 échantillons de fromage à pâte pressée expérimental et référence. Le test a pour objectif d'évaluer l'acceptation du produit fini par des panelistes grand public et d'estimer par une analyse statistique (test *de kramer*) le rang de classement et l'ordre d'acceptation.

1.1. Méthodologie de la dégustation

Une fiche de dégustation (**Annexe I.6**) élaborée suivant l'adaptation à l'objectif de l'essai est utilisée dans le présent test. Elle comporte les critères de qualité les plus élémentaires de la dégustation mais considérés comme les principales caractéristiques impliquées dans le terme de « qualité » (**Cheftel *et al.*, 1977**) à savoir l'appréciation par le dégustateur de l'Aspect visuel (Couleur), l'Olfaction et arômes, Goût et saveurs et la Texture du produit ; Chaque critère codé comporte une échelle de notation (score) commune de 1 à 4 (1 : très bon, 2 : Bon,

3 : moyen, 4 : Mauvais et la note 2,5 représente la limite d'acceptabilité). Le test est mené par 10 panélistes (**Annexe I.6**).

La différence statistique entre les lots est évaluée à l'aide du **Quick Rank Test** de **Kramer (1960)** basé sur la somme des rangs. Le seuil de probabilité est de 5% ($p : 0.05$).

Résultats et discussion

I- Caractérisation de l'extrait enzymatique obtenu

1. Matière première et extraction

1.1. Propriétés de la matière

La connaissance de la matière première source de protéases coagulant le lait ou tout autre métabolite d'intérêt technologique est un paramètre important à prendre en considération lorsqu'on bascule d'une part vers une production industrielle pour un développement durable et évaluer la contrainte environnementale d'autre part.

Faut-il rappeler que le genre *Cynara* et particulièrement l'espèce *cardunculus*, a fait l'objet de nombreux travaux de recherche et les extraits enzymatiques ont permis dans un premier temps une production ancestrale des fromages artisanaux à base de lait de chèvre et de brebis dans la péninsule ibérique pour devenir endémique par une production industrielles à travers le monde (**Abellan et al., 2012; Ordiales et al., 2013; Sales-Gomes and Lima-Costa, 2008**). Par ailleurs, les fleurs ou encore appelé foin de *cynara scolymus* sont toujours un centre d'intérêt des chercheurs par la mise en évidence de l'activité protéolytique et l'effet catalytique de l'enzyme cynarase sur les caséines des laits bovins (**Bueno-Gavila et al, 2020**).

1.2. Morphologie et propriétés physiques des foins (capitule séché)

L'extraction de l'enzyme cynarase est réalisée sur les fleurs ou encore appelé foin (ou capitule). Le rapport masse du foin avec la solution d'extraction (Solution Acétate Tampon) doit être optimal de façon d'une part à extraire le maximum d'enzyme et permettre une macération du mélange facile d'autre part. En effet, le pouvoir d'absorption des fleurs séchées est important et le manipulateur trouve des difficultés à macérer le mélange. Ce phénomène est du probablement la nature chimique des fleurs dont la composition (en %MS) selon **Siquel, 2017** (Site web : www.anses.fr) est de 36% de sucres et de 37% de fibres, molécules à forte fixation d'eau. Dans nos conditions, le mélange expérimental destiné à l'extraction de l'enzyme brut est 1g de fleurs séchées pour 5 ml de solution tampon.

1.3. Avantage et inconvénients de la matière première

L'avantage que connaît l'emploi des capitules dans la coagulation des laits réside dans l'extraction simple des enzymes en employant des solutions aqueuses non toxiques en comparaison avec l'obtention onéreuse des systèmes enzymatiques d'origine animale (Moschopoulou, 2006) ou microbienne (Kahlouche et Nouani, 2017).

En revanche, Son inconvénient majeur réside dans sa faible disponibilité, limitée durant la saison hivernale en Algérie. Bien que la production et la consommation ménagère est importante, la collecte demeure difficile et la disponibilité du substrat dépend du développement de l'industrie de la conserverie dans notre pays.

2. Caractères apparents de l'extrait enzymatique brut

2.1. Choix du tampon d'extraction du système enzymatique

Dans la technologie d'extraction industrielle de présure, on utilise généralement un milieu salé exprimé en sel de sodium additionné d'antiseptique, toutefois au laboratoire, on a recours souvent à des milieux tamponnés pour mieux caractériser l'enzyme en question. Le tampon d'extraction que nous avons utilisé est le tampon acétate de sodium de pH = 5 et de force ionique 0,1M selon le procédé rapporté par Nouani *et al.* (2009). Selon plusieurs auteurs, la nature de la solution tampon et le pH diffère et varie du pH 3 (Chazzara *et al.*, 2007) à pH 6 (Llorente *et al.*, 2004). Toutefois, les pH de départ employés seront ajustées de façon à éviter la précipitation des caséines (pH isoélectrique égal à 4,6) lors de la coagulation du lait dans la fabrication du fromage. A titre d'exemple, Egito *et al.*, (2007) a utilisé de l'eau distillée additionnée de 1% de NaCl pour l'extraction de l'enzyme coagulante des graines de tournesol alors que Cavalli *et al.*, (2008) a utilisé du tampon citrate pH 3 pour les fleurs de *Silybum marianum* (chardon marie) et Bruno *et al.*, (2002) ont extrait des protéases à partir des fruits de *Bromelia hieronymi* en utilisant le tampon phosphate pH 6 comme solvant d'extraction. Par ailleurs, une congélation-décongélation des échantillons a été effectuée. Ce procédé permet de compléter le broyage en brisant mieux les cellules végétales pour permettre aux molécules enzymatiques endocellulaires de passer en solutions. Ce passage est favorisé par la nature du tampon à forte concentration ionique et le pH acide pour la stabilité de l'enzyme. Les extraits bruts obtenus ont été filtrés sur une membrane de 0,8 µm afin d'améliorer la décoloration des échantillons et l'activité des enzymes.

2.2. Caractéristiques de l'extrait brut

L'extrait coagulant brut de fleurs d'artichaut présente une faible viscosité à l'instar des solutions aqueuses, avec une odeur légèrement prononcée et une couleur brun foncé. En effet,

la coloration brune de l'extrait enzymatique brut est due à la richesse de l'artichaut (cœur d'artichaut et fleurs) en composés phénoliques. Ceci induit le brunissement enzymatique, suite à la transformation des composés phénoliques en polymères bruns (mélanines) sous l'action des polyphénoloxydases en présence d'oxygène. Dans une étude rapportée par **Abureidah, (2013)**, 61 composés phénoliques ont été mis en évidence chez l'artichaut. En revanche, Les travaux menés par **Sidrach et al. (2005)** sur la clarification des extraits enzymatiques bruts de l'artichaut cultivé utilisant divers adsorbants (bentonites, PVP et ion échangeur) n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Par contre l'ultrafiltration de l'extrait brut à travers une membrane au seuil de coupure de 10.000 Da a permis une meilleure clarification de l'extrait. Un travail de **Nouani et al.** (Travaux non publiés), rapporte que diverses méthodes ont été utilisées afin de réduire le brunissement des extraits et ce, par l'ajout d'acide ascorbique lors du broyage, du charbon actif et du sulfite de sodium. Aucune de ces méthodes n'a donné satisfaction par contre elles ont induit une réduction de l'activité coagulante.

Tableau n°3: Caractères apparents de l'extrait enzymatique brut.

Extrait enzymatique brut de l'artichaut	Caractère apparent		
	Viscosité	Odeur	Couleur
	Raits Non visqueux	Du végétale prononcée	Brun foncé

Les essais par passage des extraits bruts sur une colonne semi préparative remplie de gel sephadex G-50 a élué une solution enzymatique purifiée et entièrement décolorée. Par ailleurs, le phénomène de brunissement des extraits est accentué lorsque la matière première (capitule séché) est mise au stockage (**figure n°15, Photo originale**).

2.3. Rendement des extraits/matière première

Comme rapporté précédemment, la masse de foin (ou fleurs séchées) employé pour l'extraction du système enzymatique est de 10 g pour 50 ml de solution tampon avec un volume d'extrait brut filtré récupéré de 37,5 ml soit ou 375 ml pour 100g de matière première. En supposant que la densité de l'extrait brut se rapproche de celle de l'eau soit une densité de un (01) le rendement d'extraction (en %) est de : 375% (m/m).

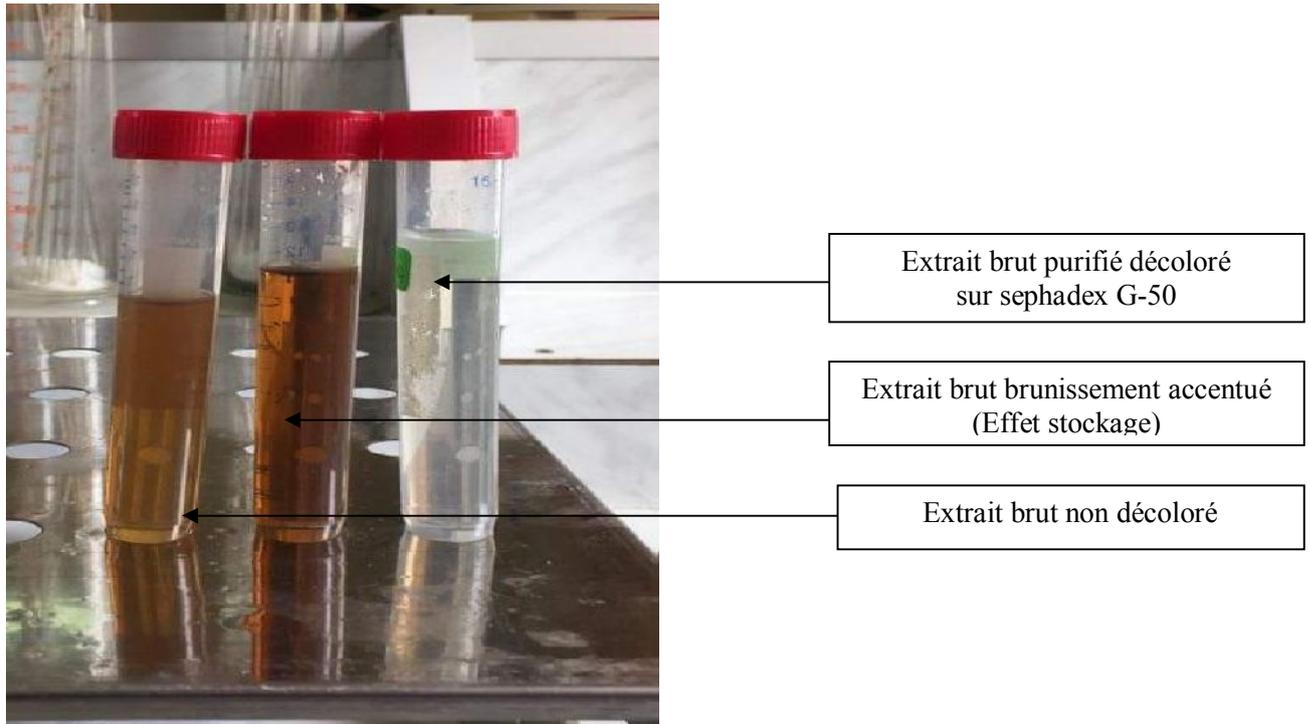


Figure n°15 : Extraits bruts purifiés et décolorés, non décolorés et effet du stockage de la matière première (fleurs séchées) sur le brunissement enzymatique

3. Propriétés biochimiques de l'extrait enzymatique brut

Bien que l'objectif de notre travail diffère de celui établi au début de l'expérimentation, basé sur l'évaluation des propriétés rhéologiques des fromages affinés, nous étions dans l'obligation de basculer vers l'étude de quelques propriétés biochimiques des extraits obtenus bien que les travaux précédemment réalisés dans le monde ont axé particulièrement sur *Cynara cardunculus*, une faible fréquence sur l'artichaut et très peu publiés en Algérie sur les enzymes de *Cynara scolymus*.

Il ya lieu de rapporter que le paramètre artichaut à savoir son biotope, et l'origine de sa culture peuvent donner des résultats relativement différents. Ainsi, un pH optimal d'activité enzymatiques des extraits enzymatiques de l'artichaut australien est de 5 ; 5,1 et 6 rapporté respectivement par **Verrissimo *et al.* (1996)**, **Heimgartner *et al.* (1990)** et **Chen *et al.* (2003)**.

3.1. Concentration en protéines totales et rendement d'extraction

La concentration en protéines totales de l'extrait coagulant brut est de 6,9 mg /ml déterminé par la méthode de Kjeldhal. En revanche, au niveau des fleurs le taux est 27 mg/g (**Tableau n°4**).

Tableau n°4: Teneur en protéines totales ou azote kjeldahl (exprimé en %)

Composés	Taux d'azote (%)	Coefficient de conversion en protéines	Taux de protéines totales (%)
Fleurs d'artichaut	0,47	5,75	2,70 ou 27mg/g
EEB	0,12		0,690 ou 6,9 mg/ml

La concentration en protéines totales de l'extrait coagulant brut est de 6,9 mg/ml (**Tableau n°4**). Cette valeur est supérieure à celle trouvée par **Pontual et al. (2012)** pour l'extrait enzymatique des fleurs de *Moringa oleifera* (2,94 mg /ml). Par contre, ce taux est beaucoup plus inférieur que ceux trouvés par **Afsharnezhad et al. (2018)** (16,58 mg/ml) et **Rajagopalan et Sukumaran (2018)** (37,8 mg/ml) respectivement pour l'extrait brut de *Wrightia tinctoria R. Br* et celui de latex de *Ficus johannis*.

Il est évident que le taux de protéines obtenu ne reflète pas la concentration en protéines recherchée (protéases), mais comporte en plus des protéines coagulantes d'autres types de protéines de nature diverse qui comporte toutes les matières azotées non protéiques. Il faut noter de même que l'activité protéasique n'est pas proportionnelle à la concentration en protéines totales des extraits bruts. Le rendement d'extraction a été calculé en % à partir du taux de protéines totales de l'extrait brut par rapport à la masse nette de la matière première utilisée, soit (**Tableau n°5**):

Tableau n°5 : Rendement d'extraction des protéines totales.

Composés	Taux de protéines totales (%)	Rendement d'extraction de protéines totales rapporté au taux protéique des fleurs(%)	Rendement d'extraction de protéines totales rapporté à la matière première (%)
Fleurs d'artichaut	2,70	25,5	2,58
EEB	0,69		

Une bonne exploitation de la matière première utilisée permet d'augmenter le rendement d'extraction des protéines totales et par conséquent des protéines enzymatiques. Sachant bien que le rendement en protéines totales est intimement liés aux rapports de la masse de fleurs mis en œuvre rapporte au volume de la solution tampon employée, du temps et de la vitesse du broyage et de la macération. Il est à noter également qu'au cours de la manipulation, on se trouve face à une perte inévitable en matière protéique.

3.2. Activités enzymatiques

L'activité coagulante obtenue de l'extrait coagulant brut des fleurs d'artichauts est de 127 US (Unité Soxhlet) (**Tableau n°6**).

Cette valeur est largement plus faible comparée à la présure commerciale dont la force est d'environ 1/10000. Toutefois, une simple comparaison demeure sans effet significatif étant donné que l'extrait brut n'a subi aucun traitement afin d'améliorer son activité coagulante. Par ailleurs, les préparations commerciales sont à l'état pur contrairement à celui de l'extrait préparé à l'état expérimental demeure brut.

Tableau n°6: Activité coagulante de l'extrait enzymatique brut des fleurs d'artichaut.

Paramètres Echantillons	Quantité employée (g)	Vol. de tampon utilisée (ml)	Vol. d'extrait coagulant brut obtenu (ml)	Temps de coagulation (sec)	Activité enzymatique (US)
	10	50	37,5	189	127

Étant donné les faibles activités enzymatiques obtenues, **Tsouli (1979)** un des pionniers des coagulases à travers les travaux de sa thèse, avait utilisé d'autres procédés pour arriver à des solutions à forte activité coagulante, en employant l'alcool éthylique. En effet, cet auteur a utilisé plusieurs procédés d'extractions en faisant varier la température de broyage des fleurs et la concentration en NaCl des solutions d'extraction et en utilisant différentes variétés, à différents stades de développement. La conclusion de ses travaux montre que le stade de développement et la variété du végétal sont très importants ; l'activité est meilleure dans le cas de la variété sauvage que dans le cas de la variété cultivée. Quant au stade de développement, les capitules les plus développés donnent une activité plus importante. Ces résultats sont en accord avec les anciens travaux sur les présures obtenus par **Christen et Virasoro (1935)**.

Comparé aux résultats des travaux menés sur les présures végétales, la valeur observée chez nos échantillons (**127 US**) semblent plus importante que celle rapportée chez l'extrait de fleurs de *Calotropis gigantea* (crown flower) (**Anusha et al., 2014**), de *Scorzonera hispanica* L. (scorsonère d'Espagne) (**Nadaruglu et al. 2012**). Ainsi, **Park et al. (2000)** ont montré que la protéase aspartique purifiée de *Helianthus annuus*, variété IS-3311, présente une activité coagulante presque négligeable ($20 \sim 10^{-3}$ U mg⁻¹, déterminée à 35°C et pH 6,0). La même tendance a été rapportée par **Egito et al. (2007)** ($5,8 \cdot 10^{-3}$ et $39 \cdot 10^{-3}$ U mg⁻¹), respectivement sur les graines de *Albizia lebbek* (bois noir des Bas) et *Heliantus annus* (Tournesol). Par contre, **Luo et al. (2018)** ont enregistré des activités coagulantes plus meilleures que celle de

l'EEB pour les deux protéases issues des feuilles de *Cynanchum otophyllum* Schneid (1/332.6 et 1/267.4).

Il est évident que ces protéases coagulant le lait ont été obtenues selon différents protocoles d'extraction peuvent présenter des résultats contradictoires. La différence en valeur d'activité coagulante peut être due, d'une part à la différence des procédés mis en jeu où la composition chimique de chaque tampon influencerait sur certains caractères du système enzymatique des fleurs d'artichauts. De plus et d'une manière générale, autant que la teneur en matière sèche totale des extraits coagulants végétale est élevée autant que leur activité est importante. En revanche, exprimée en unité présure notre extrait enzymatique a une activité coagulante de l'ordre de 1,67 UP, cette valeur est faible par rapport à celle trouvée par **Mekhaneg et al. (2018)** qui est de l'ordre de $11,1 \pm 0.2$ UP pour l'extrait brut de proventricule de *Meleagris gallopavo*.

Tableau n°7: Comparaison de l'AC de l'EEB aux autres AC des coagulases d'origine végétale

Coagulases	Activité coagulante (US)	Références
EEB de <i>Cynara scolymus</i>	127	Notre échantillon
<i>Cynara cardunculus</i>	40.00 ± 4.01	(Liburdi et al., 2018)
<i>Withania coagulans</i> fruit	40.0 ± 3	(Salehi et al., 2017)
<i>Wrightia tinctoria</i> R. Br	552.802	(Rajagopalan et Sukumaran, 2018)

En matière d'activité protéolytique exprimée en valeur de l'absorbance des hydrolysats des caséines sous l'effet des extraits bruts à 660 nm semble élevée comparée à la limite des DO qui vérifie la loi de Beer Lambert. En utilisant un volume de l'extrait enzymatique de 0,2 ml, l'absorbance après incubation et l'effet catalytique, est égale à **1,49** et avec 1 ml d'extrait, elle est de **3,2**. Ainsi, l'action de rupture de la liaison *Phe105-Met106* de la caséine K par les aspartyl protéases comme l'extrait de l'artichaut est semblable à celle de la chymosine et les autres protéases d'origine fongique et bactériennes (**Sidrach et al., 2005**) et l'effet protéolytique est identique à celui des extraits de *Cynara cardunculus* qui sont largement utilisés dans la fabrication des fromages (**Silva et al., 2002**). Dans la littérature, des enzymes coagulantes, l'activité protéolytique est importante pour les coagulases d'origine végétale (artichaut, figuier) en comparaison avec la présure commerciale. Selon **Barbosa (1983)**, les protéases microbiennes et végétales manifestent une forte activité protéolytique par rapport aux protéases d'origine animale.

3.3. Détermination du rapport AC/AP

La mesure de l'indice permet de confirmer le pouvoir coagulant des succédanés de la présure. Dans nos conditions expérimentales, l'indice AC/AP de l'extrait enzymatique à l'état brut de la protéase des fleurs d'artichaut a été estimé à 85,23. En comparant l'indice observé par rapport à celui rapporté par **Brutti et al. (2012)** des différentes plantes (**Tableau n°8**), il semblerait que la valeur trouvée est appréciable et confirme les aptitudes de cette espèce à être employé dans l'industrie fromagère (**Silva et al., 2002**).

Tableau n°8: Valeurs du rapport AC/AP des enzymes coagulant le lait de quelques plantes (**Brutti et al., 2012**).

Espèce végétale	AC (UP/ml)	AP (Ucas/ml)	AC/AP
<i>Onopordum acanthium</i>	0,546	0,019	9,58
<i>Cynara cardunculus</i>	103,6	16,4	5,34
<i>Bromelia balansae</i>	6,85	1,32	5,19
<i>Bromelia hieronymi</i>	10	2,39	4,18
<i>Chymosin bovine</i>	784	0,04	19607
<i>Cynara scolymus</i> (Notre échantillon)	127 (US)*	1,49 (DO) *	85,23

UP : Unité présure, Ucas: Unité caseinolytique.

* : Pour notre échantillon l'activité enzymatique et l'activité protéolytique sont exprimées en Unité Soxhlet (US) et DO respectivement.

3.4. Action des effecteurs sur l'activité coagulante

Le tableau suivant résume les résultats de l'effet des inhibiteurs sur l'activité enzymatique des extraits coagulants dont l'enzyme responsable de la coagulation du lait est la cynarase. Le temps de coagulation est pris après une incubation de 400 secondes max.

Il est connu que les inhibiteurs du site actif des protéases ont été utilisés pour identifier le groupe auquel la protéine étudiée appartient et donnent principalement un aperçu sur la nature de son site actif.

Tableau n°9 : Effet des inhibiteurs sur l'activité de l'extrait enzymatique brut des fleurs d'artichaut.

paramètres inhibiteurs	Activité coagulante (US)	Activité relative Résiduelle	Activité relative Inhibée
EEB	127	100	0
2-mercaptoethanol	88,3	69,50	30,5
EDTA	83,8	65,98	34,02
Pepstatine-A	0	0	100

Parmi les inhibiteurs testés, **le tableau n°9** montre que l'extrait enzymatique brut a retenu environ 69,50% de son activité en présence du 2-mercaptoethanol, tandis que l'EDTA a réussi à supprimer que 34,02% de l'activité enzymatique. Cependant, la Pepstatine A à 0.02 mM a montré un effet apparent dans l'activité enzymatique et inhibait significativement l'activité coagulante provoquant 100% d'inhibition.

En effet, plusieurs auteurs ont rapporté auparavant que les protéases végétales issues des fleurs de *Cynara scolymus* appartiennent à la famille des protéases à aspartate (**Chazarra et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Sidrach et al., 2005**).

4. Résultat de la purification d'exclusion sur colonne analytique Sephacryl S-200.

Le profil chromatographique de l'extrait coagulant brut de l'artichaut (*Cynara scolymus*) sur gel de filtration sephacryl S-200, réalisé avec un dépôt de 1ml montre 3 pics d'absorption bien distincts (**Figure n°16**).

Les essais d'activité coagulante pratiqués sur toutes les fractions ont montré que le 1^{er} élué à la 22^{ème} fraction et le 3^{ème} pic élué à la 49^{ème} fraction sont inactifs alors que le pic situé en 2^{ème} position, selon l'ordre d'éluion (40^{ème} fraction) est doué d'une activité coagulante. Le volume élué des fractions est de 16 ml (37^{ème} à la 44^{ème} fraction).

Il ya dire que la chromatographie d'exclusion est considérée comme une méthode de pré-purification qui nécessite un complément de méthodes de séparation afin d'éluer les autres enzymes douées d'activité coagulante. En effet, les anciens travaux sur l'artichaut rapportés par **Llorente et al. (2004)** ont utilise une purification des extraits par échangeuse d'anions (DEAE- Sepharose fast flow) suivi d'une chromatographie d'affinité sur Agarose- pepstatine pour éluer 3 pics actifs identifiées comme les cynarases A,B et C. Les mêmes observations

ont été développées par Sidrach *et al.* (2005) puis repris par Chazzara *et al.* (2007) et Esposito *et al.* (2016).

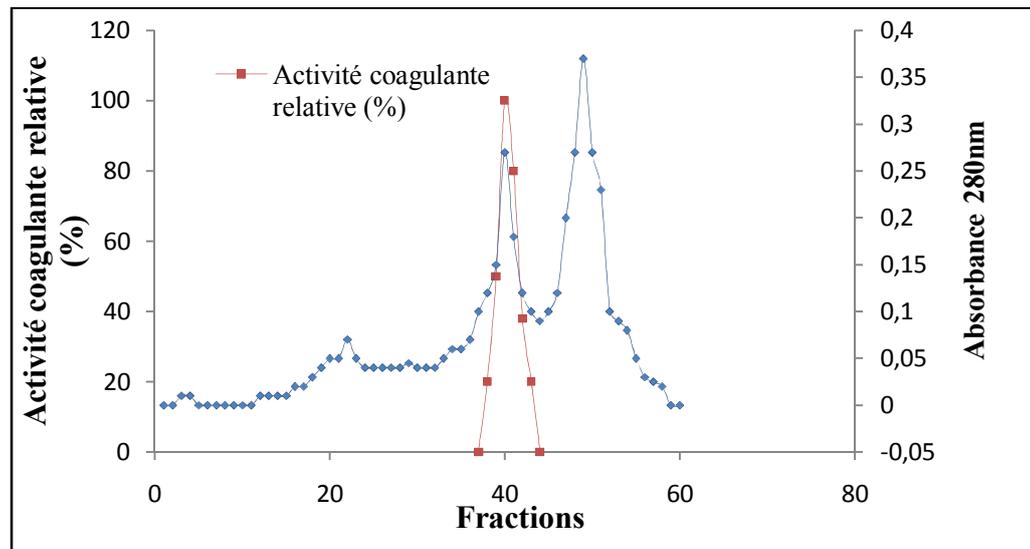


Figure n°16: Profil chromatographique de l'extrait enzymatique brut de *Cynara scolymus* sur Sephacryl S-200. Débit:0,2ml/mn. Fraction : 2 ml/fraction. Colonne : 80cm×1,5cm.

4.1. Propriétés biochimiques de l'extrait enzymatique purifié.

L'objectif principal de l'élution des extraits bruts à travers une colonne semi préparative sur gel sephadex G-50 est la récupération d'un volume d'éluât purifié appréciable destiné à des analyses plus fines à l'instar de l'électrophorèse ainsi que la rétention des pigments colorés, facteur limitant de certains extraits végétaux. Cependant, certains paramètres ont été déterminés pour mieux évaluer les caractéristiques de l'enzyme purifiée.

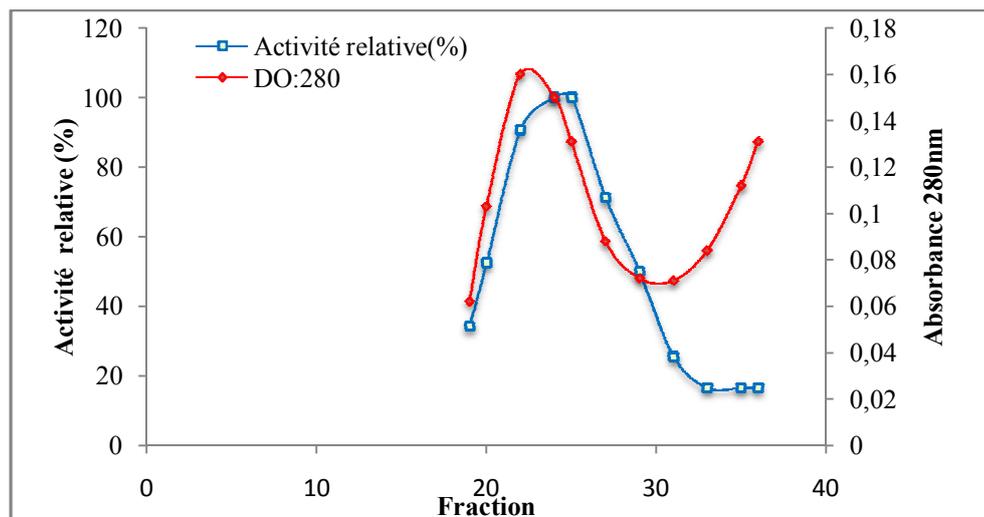


Figure n°17: profil chromatographique de l'extrait enzymatique brut de *Cynara scolymus* sur Colonne semi preparative sur gel Sephadex G-50 (Débit : 0,6ml /mn. Fraction : 2,5ml/Fraction).

Les résultats obtenus après mesure des activités coagulantes des fractions actives suite à l'élimination d'une importante quantité de pigments colorés et de protéines contaminantes, Le profil élué indique la présence d'un seul pic actif (**Figure n°17**). Il correspond à la totalité des fractions d'un volume de 25ml dotés d'une activité coagulante de 33 US, et d'un taux de protéines de 21µg/ml.

4.2. Rendement en enzyme purifiée

25 ml d'extrait purifié récupéré après purification sur G50 a été obtenu à partir d'un dépôt de 7ml d'extrait brut soit un taux de protéines enzymatique de : 75µl de cynarase / ml d'extrait brut soit environ 11mg de cynarase /g de protéines brutes. Un rendement qui peut dépendre de nombreux paramètres liés au procédé et aux conditions d'extraction, à la matière première, au rapport à la masse de feuilles rapportée au volume de tampon, aux solutions de macération...

4.3. Identification des cynarases par la SDS-PAGE

Le volume d'extrait purifié a été concentré pour une identification résolutive des bandes électrophorétique. En effet, l'électrophorèse SDS-Page a permis de localiser 2 bandes qui nous semblent beaucoup plus des sous unité de la cynarase avec des poids moléculaires respectifs de 36 et 26 kDa (**Figure n°18**) et (**Tableau n°10**).

Tableau n°10: Détermination du poids moléculaire de la fraction active (cynarase).

Protéines	Rf	Log PM	PM (kDa)
Lactoferrin from human milk	0,13	1,95	90
β-galactosidase from <i>E.Coli</i>	0,18	1,76	58
Lactoferrin from human milk	0,24	1,68	48,5
kinase (rabbit muscle)	0,46	1,55	36
Fumarase (porcine heart)	0,69	1,41	26
Cynarase sous unité 1	0,46	1,54	36
Cynarase sous unité 2	0,57	1,42	26

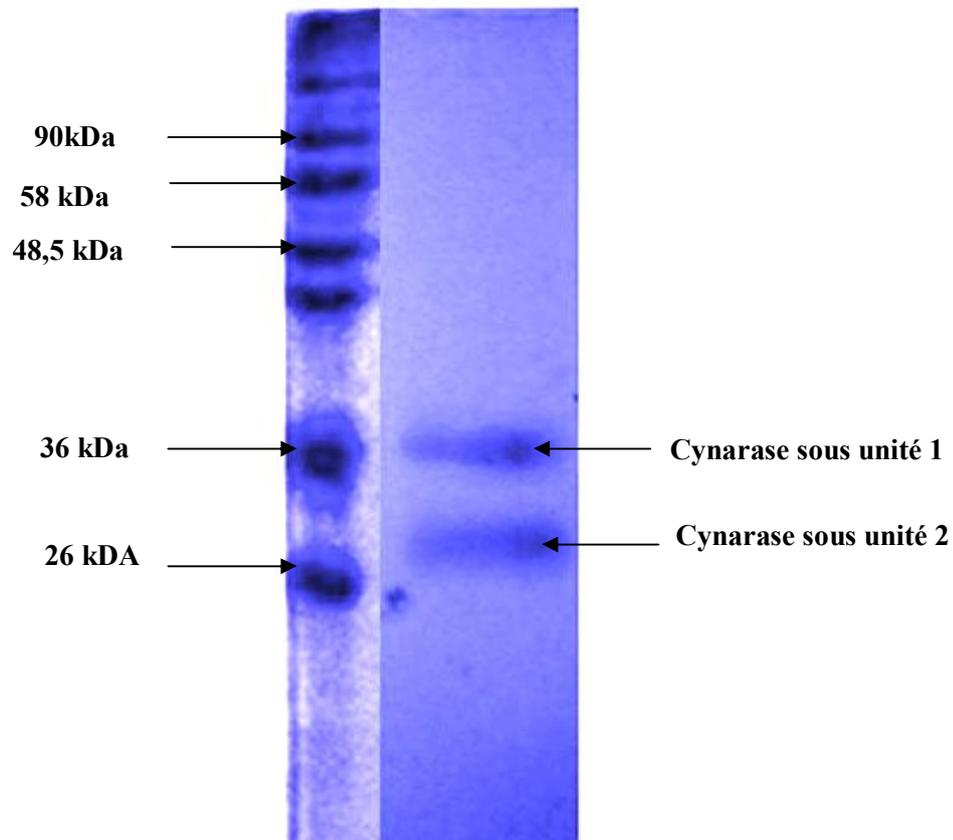


Figure n°18 : Profil électrophorétique de la fraction active issue d'une chromatographie sur Sephadex G-50 de l'extrait purifié de *Cynara scolymus*.

De nombreux auteurs ont rapporté les mêmes conclusions sur la présence de deux sous unités de cynarase de *cynara scolymus* (**Chazzara et al., 2007 ; Llorrente et al., 2004 ; 2014**). Ces auteurs confirment leur présence au niveau principalement des fleurs d'artichaut avec des activités respectives coagulante et protéolytiques. Ces sous unités sont sensibles au calcium avec une similarité d'action que la chymosine dans la fabrication du fromage type GOUDA. Cependant des différences de PM peuvent être observées et cette caractéristique dépend de l'origine de la coagulase. En effet, **Sidrach et al. (2005)** rapportent des PM de l'ordre de : 42900, 46000, 45500 Da, pour les 3 cynarase (A, B et C) respectivement, identifiées chez *Cynara scolymus*.

Gagaoua et al. (2017) ont enregistré un PM de 68400 Da pour la coagulase de *Cucumis melo var. reticulatus*. Comparés aux protéases animales, les travaux ont indiqué des poids moléculaires compris entre 31 000 et 37 000 Da (**Fox et Whitaker, 1977**). Selon **Garnot et Martin (1979)**, la chymosine et la pepsine sont caractérisées par une masse de 30 000 Da et de 35 000 Da respectivement.

Tableau n°11: Comparaison du poids moléculaire de l'extrait enzymatique de l'artichaut aux autres poids moléculaires des coagulases à cystéine d'origine végétale.

Enzyme (source)	Masse moléculaire (kDa)	Références
Cynarase sous unité 1	36	
Cynarase sous unité 2	26	Notre échantillon
Figuier (<i>F. johannis</i>)	25	(Afsharnezhad <i>et al.</i> , 2018)
Zingibain (<i>Z. officinale</i>)	33,8	(Gagaoua <i>et al.</i> , 2015)
Nivulian-II (<i>E. nivulia</i>)	43,47	(Badgular <i>et al.</i> , 2014)
Actinidain (<i>A. chinensis</i>)	24	(Katsaros <i>et al.</i> , 2010)
Procerain (<i>C. procera</i>)	28,8	(Dubey <i>et al.</i> , 2003)

Selon Afsharnezhad *et al.* (2018) la majorité des protéases à cystéine d'origine végétale sont de petites protéines dont les masses moléculaires sont comprises entre 20 et 35 kDa.

4.4. Résultat de l'influence de quelques paramètres sur l'activité de l'extrait coagulant purifié de l'artichaut et d'*Aspergillus niger* var. *awamori*

➤ Influence de la température du lait

D'une façon générale, les enzymes d'origine végétale se caractérisent par des températures optimales d'activité et des températures létales bien supérieures à celles que l'on observe dans le cas des enzymes d'origine animale et de la présure en particulier. Plusieurs travaux antérieurs (Alais et Lagrange, 1972 ; Barboasa *et al.*, 1976 ; Walde *et al.*, 1984 ; Bruno *et al.*, 2002 ; Lo Piero *et al.*, 2002 ; Nouani, 2009 ; Gagaoua *et al.*, 2017 ; Afsharnezhad *et al.*, 2018) ont confirmé ces observations.

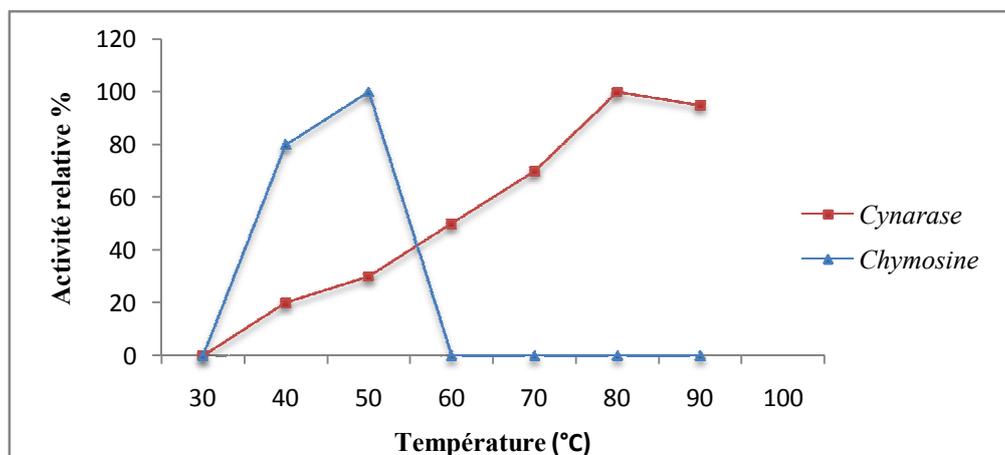


Figure n°19: Influence de la température sur l'activité coagulante relative de la Cynarase et la Chymosine d'*Aspergillus niger*.

En effet, au dessus de 50°C la présure commerciale marque une perte d'activité, contrairement à la cynarase qui présente une activité croissante en fonction de la température, dépassant ce seuil (50°C) avec un optimum d'activité coagulante à 80°C (**Figure n°19**). Ce n'est qu'à partir de cette température que l'activité de la cynarase commence à diminuer.

Bey et al., 2018 ont enregistré que l'activité coagulante, de l'extrait coagulant de *Foeniculum vulgare*, est stable à des températures allant de 35 à 45°C avec une activité maximale à 60°C puis diminue à 65°C. Cependant une température optimale de 45°C est observée chez la protéase de *Bacillus subtilis* MTCC 10422 (**Kumari Narwal et al., 2016**).

D'une part, Compte tenu des résultats obtenus dans notre étude, il semblerait que les coagulases d'origine végétale ont l'avantage d'accélérer le processus technologique de fabrication de fromage, dans le cas où la coagulation du lait se ferait à des températures élevées. D'autre part, on pourrait conclure que les coagulases d'origine végétale et microbienne se montrent plus actives aux températures élevées par comparaison aux protéases animales.

➤ Influence du pH du lait

Les variations de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique en fonction du pH du lait ont été déterminées en faisant varier le pH du lait de 5,2 à 7,2 avec un pallier de 0,2.

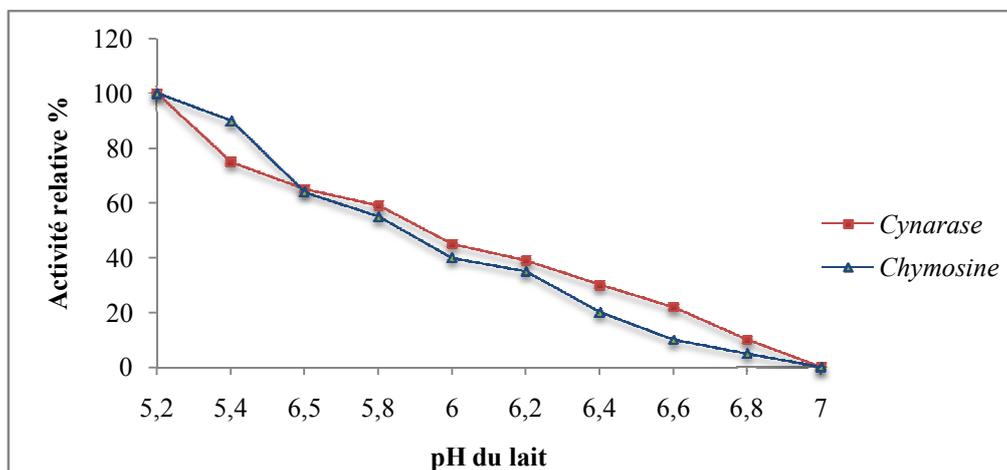


Figure n°20: Influence du pH du lait sur l'activité coagulante relative de la Cynarase et la Chymosine d'*Aspergillus niger*

Les résultats enregistrés lors de notre expérimentation montrent que le temps de coagulation le plus court est observé à pH 5,2 pour les deux coagulase.

Au-delà de cette valeur l'activité baisse considérablement et à pH 7 la cynarase et la présure sont complètement inactivés.

Llorente et al. (2014), rapportent que l'activité optimale de la coagulase extraite à partir de l'artichaut se situe entre pH 4,5 et 5,5.

Par ailleurs, **Rajagopalan et Sukumaran (2018)** ont enregistré un pH optimal de 7,5 pour la coagulase extraite à partir de laurier (*Wrightia tinctoria*). Après l'extraction et la purification d'une coagulase à partir de *Aspergillus foetidus*, **Souza et al. (2017)** ont marqué une activité coagulante maximale à pH 5.

Les valeurs habituelles en pH, utilisées en technologie fromagère sont de pH 6,3 à 6,5. Dans certains cas, quand les conditions technologiques le permettent (cas des fromages frais, fromages fermentés à pâte molle), le pH du lait peut être abaissé à pH 6,2.

Selon **Garnot et Martin (1979)**, le pH de 6,7 correspond à des laits non acidifiés, utilisés particulièrement en fabrication de fromages à pâtes pressées. Dans la fabrication de fromages à pâtes molles type camembert, une préacidification lactique est nécessaire, pouvant abaisser le pH du lait vers 6,4. Les deux types de fabrication sont obtenus essentiellement par coagulation enzymatique, nécessitant une dose beaucoup plus élevée dans le premier cas que dans le second.

➤ Influence de la concentration en CaCl_2 du lait

La variation de la concentration en CaCl_2 du lait est obtenue par addition des doses croissantes d'une solution dans un intervalle de 0 M à 0,02M de CaCl_2 dans le but de situer l'optimum de l'activité coagulante de la cynarase.

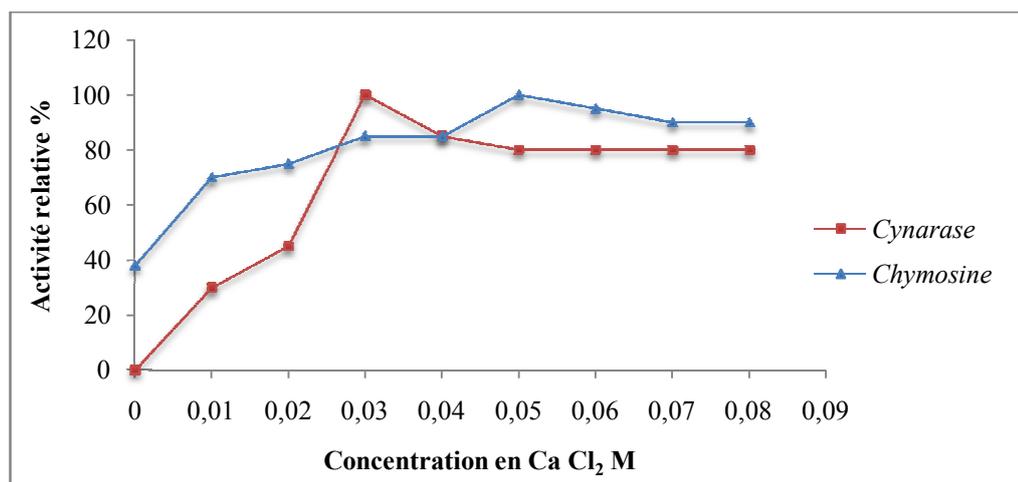


Figure n°21: Influence de la concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante relative de la Cynarase et la Chymosine d'*Aspergillus niger*.

Dans l'intervalle de concentration du lait en CaCl_2 (0 à 0,09M), l'activité coagulante de la cynarase augmente progressivement en fonction de la concentration en CaCl_2 passant de 1% à 45% (**figure n°21**). La chymosine d'*Aspergillus niger* révèle des activités de 38% à 77% pour le même intervalle (**Figure n°21**).

Au-delà de l'intervalle (0 à 0,02M), l'activité de la cynarase augmente et marque un optimum d'activité à la concentration (0,03M). **Alirezaei et al. (2011)** ont trouvé que l'optimum de concentration en CaCl_2 est de 0,025M pour l'extrait enzymatique d'*Actinidia Chinensis* (variété de Kiwi). Ainsi, **Ding et al. (2011)** ont enregistré une activité coagulante maximale à 0,05 M pour la coagulase extraite à partir de *Bacillus subtilis*.

Il semble que les coagulases d'origine végétale sont très sensibles aux faibles concentrations en CaCl_2 du lait, et présentent de plus basses activités par comparaison aux coagulases d'origine animale et microbienne.

➤ Influence de la masse d'extrait enzymatique coagulant purifié

Les résultats obtenus indiquent une augmentation de l'activité coagulante des deux coagulases avec l'augmentation de la concentration en enzyme jusqu'à atteindre un maximum d'action.

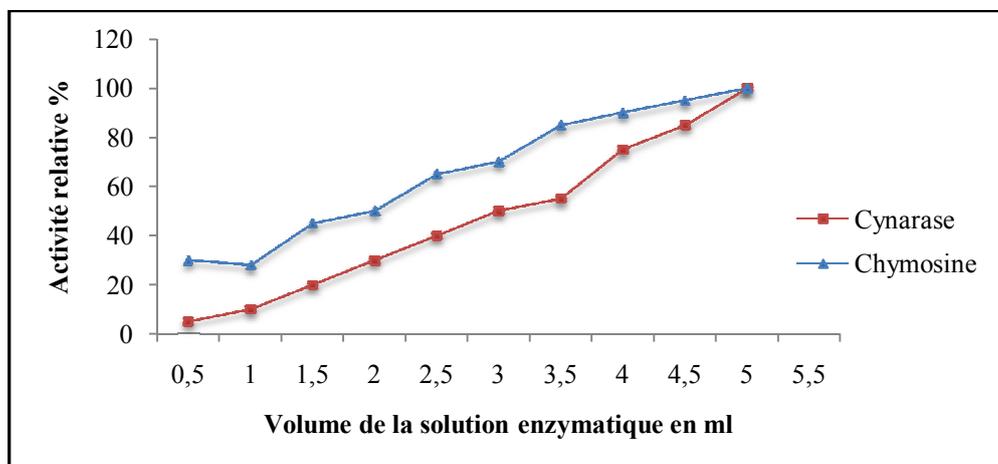


Figure n°22: Influence de la masse d'extrait enzymatique coagulant de Cynarase et la Chymosine d'*Aspergillus niger* sur l'activité coagulante relative.

La **figure n°22** illustre que le comportement de la chymosine d'*Aspergillus niger* est très proche de celui de la cynarase. Toutefois, l'allure très rapprochée de la cinétique de coagulation est marqué par un écart d'environ 20% entre les deux enzymes.

Tenant compte de ces observations, à doses faibles l'utilisation de la cynarase donnerait des temps de coagulation élevés ; et à doses élevées, cette coagulase donnerait probablement une

forte activité protéolytique. Ainsi, il serait convenable d'utiliser des concentrations relativement moyennes pour avoir des temps relativement courts et améliorer l'aptitude à la coagulation du lait.

II- Propriétés rhéologiques et sensorielles du fromage à pâte pressée non cuite

1. Propriétés rhéologiques

1.1. Qualité du lait de vache

1.1.1. Composition physicochimique

Les résultats des principaux indices physicochimiques du lait destiné à la fabrication du fromage sont consignés dans le **tableau n°12**.

On rappelle que les échantillons de lait ont été obtenus chez un éleveur de vache laitière d'une ferme située dans la commune de *Boudouaou*. Ces échantillons sont récupérés juste après la traite du matin sans aucun traitement préalable de pasteurisation.

Tableau n°12: Résultats des Analyses physico-chimiques du lait de vache collecté.

Paramètres	Lait de vache	Valeur (norme AFNOR ,1986)
pH (25 °C)	6.58	6.55 – 6.65
Acidité titrable (°D)	15	16-17
Densité	1028.2	1028 - 1030
Matière grasse (g/l)	42	30-44
E.S.T (g/l)	128,9	-
Caséines totales (g/l)	24,15	-

Le lait analysé montre une composition de qualité et une fraîcheur apparente. Ce sont des indices qui répondent aux normes de fraîcheur selon la norme **AFNOR (1986)** repris par le **journal officiel de 1998**. Le taux élevé de matière grasse observé chez les échantillons, analysée en duplicate démontre vraisemblablement que les animaux consomment des aliments concentrés avec un pâturage réduit et passent un temps plus long à l'étable.

Par ailleurs, la détermination du taux de caséines dans les laits destiné à la fabrication des laitages, revêt une grande importance. En effet, Si les protéines solubles du lait ont une valeur nutritionnelle élevée (**Alais, 1984**), seules les caséines comptent pour le fromager puisqu'elles

déterminent en grande partie le rendement de transformation du lait en fromage (**Hurtaud et al., 1993**). Ce caractère détermine l'utilisation des présures de remplacement en technologie fromagère et dépendent d'un certain nombre de facteurs liés à leurs potentiels d'utilisation technologique et les aptitudes des différents laits à la coagulation, paramètres qui influent sur la qualité des fromages (**Johnson et al., 2001**). Le taux observé chez nos échantillons soit 24g/l (exprimé en azote total) rejoint les concentrations rapportées par la littérature (**Park et al., 2007**).

1.1.2. CPG de la matière grasse

L'analyse par chromatographie phase gazeuse de la matière grasse du lait permet d'évaluer d'une part la qualité de la matière grasse et d'autre part, déterminer les tentatives de remplacement de la matière grasse animale par la graisse végétale. Ainsi, la qualité des laits analysés confirment son statut comme un lait destiné à la transformation fromagère. En effet, pour des considérations analytiques et pour confirmer la qualité des laits expérimentaux, nous avons déterminé le profil chromatographique de la matière grasse et axer nos observations sur la concentration de l'acide linoléique (voir **profil en Annexe I.7**), le C_{18:2}, un précurseur des Oméga 6. La valeur trouvée est de 2,06% rapporte au taux de matière (100%), Cette valeur confirme l'origine animale des lipides du lait employé.

1.2. Préparation et rhéologie du fromage

1.2.1. Rendement fromager

Le rendement fromager ou le rendement de la transformation du lait en fromage est l'expression mathématique de la quantité de fromage obtenu à partir d'une quantité donnée de lait (**Vandeweghe, 1997**). La moyenne des rendements calculés sur des échantillons dupliqués après l'étape de pressage, a donné les résultats suivants :

Fromage présure : 572g pour 5 litres de lait ;

Fromage extrait d'artichaut : 561g pour 5 litres de lait.

En tenant compte de la densité du lait égal à : 1028.2, les rendements en fromage sont les suivants :

Fromage présure : 11,12% (p/p)

Fromage extrait d'artichaut : 10,9 % (p/p).

Les rendements fromagers semblent faibles mais proches l'un de l'autre (soit une différence de 0,21%,) valeur qui paraît négligeable bien que les pertes durant les différentes étapes de fabrication son inévitables. Toutefois, **Alais (1984)** et **Eck (1990)**, rapportent dans d'anciens

travaux que les fromages fabriqués à partir de coagulases d'origine végétale présentent une baisse dans le rendement fromager, due à une forte attaque des caséines par ces coagulases, avec libération de substances peptidiques solubles dans le sérum et provoquant une diminution de l'extrait sec total dans le coagulum.

✓ Observations sur la préparation du fromage

Bien que la préparation a été réalisée dans les conditions identique aux 2 échantillons, il ya lieu de relever certaines observations qui dépendent des caractères intrinsèques de la présure employée. En effet, lors de l'emprésurage un temps de prise plus long caractérise les extraits enzymatiques par rapport à la présure commerciale. Un coagulum plus ferme est observé avec la présure de référence contre un coagulum à petits flocons pour les échantillons expérimentaux. Enfin, une pate pressée plus salée au goûté chez les échantillons à base d'extraits d'artichaut.

1.2.2. Viscosité et contrainte durant les différentes phases du process : liquide emprésuré, gel présure et fromage affiné et effet des extraits et de la présure commerciale.

Afin d'étudier l'effet des extraits enzymatiques des fleurs séchées de l'artichaut (*Cynara scolymus*) comparé à une présure commerciale d'origine microbienne sur le comportement rhéologique d'un fromage à pâte pressée non cuite et affiné pendant 10 jours, nous avons représenté l'évolution de la viscosité apparente et de la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement exprimé en Seconde⁻¹ (S⁻¹). Afin de mieux comprendre le comportement rhéologique, les trois principales phases de préparation du fromage ont été mis en évidence, à savoir la phase liquide après 5 mn d'emprésurage, la phase gel et enfin la phase d'affinage (environ 10 jours). En effet, **Kfoury et al. (1988)** ont rapporté que la texture d'un fromage est un paramètre important pour son classement et l'appréciation de sa qualité et dont les premières études ont été effectuées par **Baron et Scottblair (1953)**.

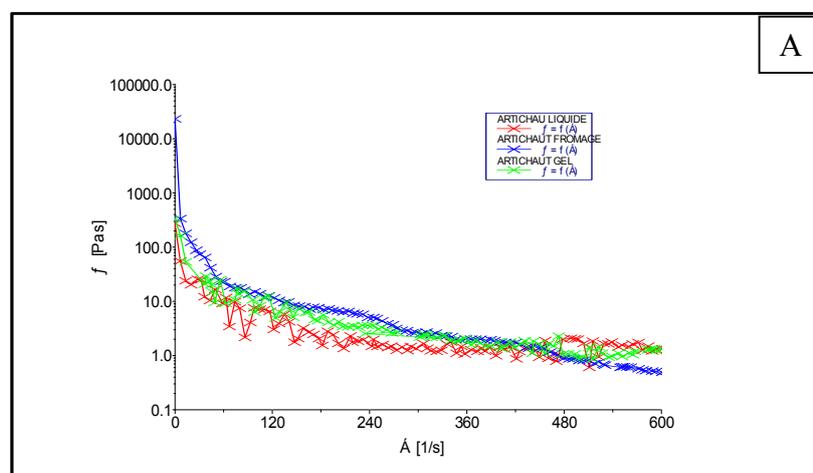
🚦 Viscosité apparente

Le graphe de la **figure n°23** représente l'évolution de la viscosité du fromage en fonction de la vitesse de cisaillement en géométrie plan plan. Cette évolution négative, c'est à dire la viscosité diminue en augmentant la vitesse d'écrasement rotationnel du produit entre les 2 surfaces du plan. L'allure des courbes est identique pour l'ensemble des échantillons et la diminution de la viscosité des échantillons est caractéristique d'un comportement rhéofluidifiant. On remarque que le profil de la vitesse apparente des échantillons est similaire après 600 secondes de traitement. Aucune différence n'est observée entre l'action de la

présure de référence et l'extrait d'artichaut sur les caséines du lait de fabrication. Cet état de fait concerne les trois phases de fabrication du fromage à savoir la phase liquide ou la phase d'emprésurage, la phase de gélification et enfin la phase pâte pressée.

Cependant une remarque s'impose sur le protocole employé dans la mesure de la viscosité apparente de la pâte. Par rapport aux deux premières phases, l'échantillon de pâte a été humidifié pour pouvoir effectuer cette mesure ce qui a pour conséquence une valeur de la viscosité qui rejoint celle des autres phases.

A travers ces premiers résultats, il ya lieu de rapporter que les présures des 2 échantillons se caractérisent par des facteurs intrinsèques identiques (*voir discussion plus haut*) à savoir l'appartenance à la même famille des aspartyl protéases, et un clivage similaire de la liaison phe₁₀₅-met₁₀₆ de la caséine kappa. La similarité des facteurs semblent donner des résultats qui se rejoignent et qu'on retrouve dans le rendement fromagers très proches et des propriétés sensorielles semblables (*Cf. Test de dégustation*). En revanche, d'autres facteurs peuvent intervenir sur la modification de la texture des produits. **Hurtaud et al. (2009)** rapportent que les caractéristiques rhéologiques des fromages sont influencées par les paramètres technologiques mis en œuvre (traitement thermique du lait, standardisation de la matière grasse, doses et natures des levains ou durée d'affinage). Les travaux de **Javier Solorza-Feria et al. (2011)** sur les effets des protéases végétales (papaine et bromélaïne) et la chymosine sur l'hydrolyse d'une solution de caséine à différentes concentration et à différents pH et les résultats rhéologiques ont montré que les produits générés après hydrolyse se sont comportés comme des systèmes non newtoniens après effet du cisaillement avec une limite d'élasticité. Par ailleurs, une augmentation significative de la viscosité a été observée lors du passage de 3 à 12 g / 100 ml d'une solution de caséine employée comme substrat des présures.



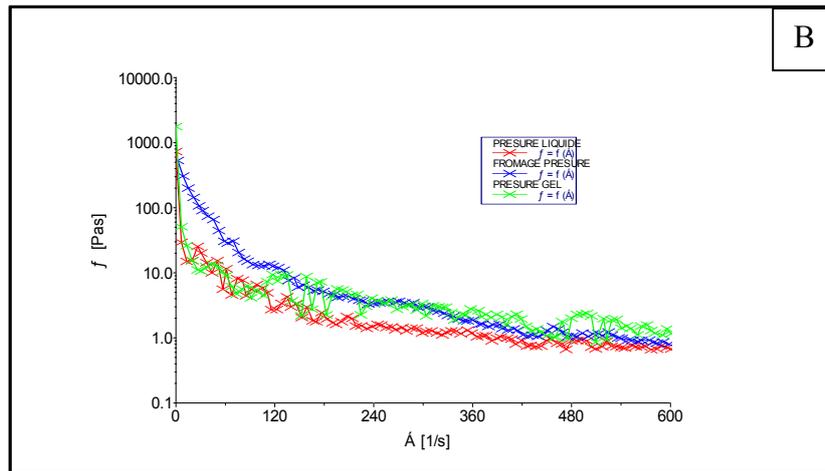
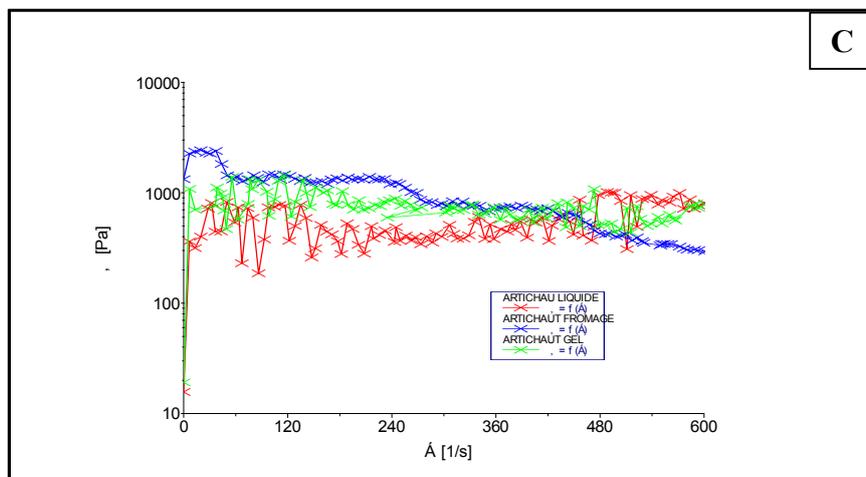


Figure n°23: Viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement d'un échantillon de fromage à pâte pressée à différentes phases de préparation (**A** : Echantillon à base d'extraits d'artichaut ; **B** : Echantillon à base de présure.)

- **En rouge** : Phase d'emprésurage (liquide), analyse après 5mn ;
- **En vert** : Phase gel ;
- **En Bleu** : Phase pâte pressée.

🚩 Contrainte de cisaillement

La contrainte de cisaillement des échantillons sont exprimés par les courbes de la **figure n°24**. Dans ce type de fluide, la contrainte de cisaillement augmente avec la vitesse. Ce type de courbe est caractéristique des produits pseudoplastiques tels que le gel fromage ou le fromage en fin d'affinage. Il est à noter que la résolution des courbes n'est pas homogène particulièrement pour les extraits d'artichaut. Toute fois les résultats manifestent une tendance similaire entre le 2 échantillons et pendant les 3 phases. Le même comportement peut être expliqué comme rapporté dans la mesure de la viscosité.



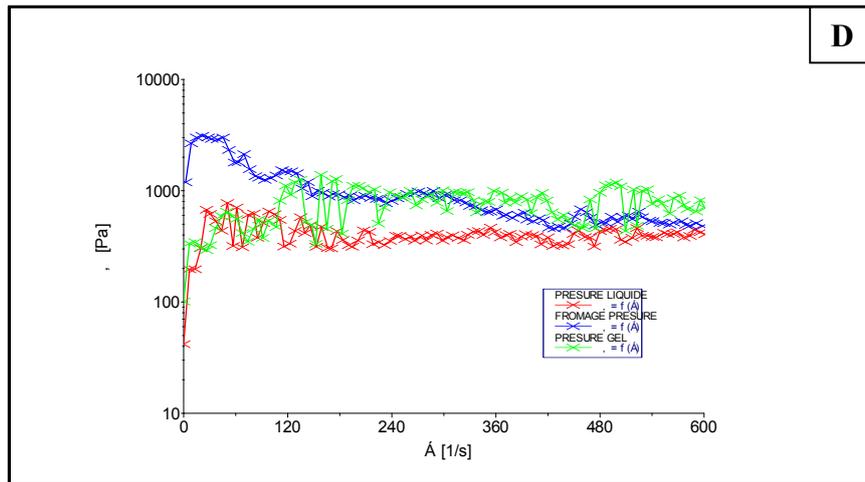


Figure n°24: Contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement d'un échantillon de fromage à pâte pressée à différentes phases de préparation (**C** : Echantillon à base d'extraits d'artichaut ; **D** : Echantillon à base de présure.)

1.2.3. Effet comparé de l'emprésurage des laits par l'extrait enzymatique et la présure commerciale sur le potentiel zêta.

Cet essai repose sur l'effet des présures de remplacement par rapport à une présure de référence sur le potentiel zêta des échantillons lors de la phase de coagulation. La littérature rapporte que pour un système enzymatique la protéolyse de la caséine κ , en périphérie des particules caséiniques, est obtenue par action enzymatique et conduit à la libération, dans le sérum, du caséinomacropéptide (CMP), porteur d'une charge négative. Schématiquement, ce mode de coagulation entraîne la réduction du potentiel zêta et l'altération structurale de l'enveloppe protéique des micelles de caséines. Il en découle une perte de stabilité de ces particules, par diminution des forces de répulsion électrostatique et stérique, à l'origine de l'induction de l'agrégation, puis de la gélification du système (**Vetier et al, 1999**).

Dans notre étude, la mesure du potentiel a été réalisée durant la phase d'emprésurage et début de gélification. Les résultats de la mesure du potentiel à 25°C sont consignés dans le **tableau n°13**.

La moyenne du potentiel zêta calculé sur 5 essais est respectivement de **32,34 mV** pour l'échantillon de présure commerciale et **33,34 mV** pour l'échantillon d'extrait d'artichaut.

Bien que les valeurs du zêta observées sont proches les unes des autres, soit une différence de 1 mV de moins chez l'échantillon présure, les extraits semblent moins rapides dans la formation du gel cynamase par rapport au gel présure.

Tableau n°13: Potentiel zêta des échantillons de Cynarase et présure après emprésurage.

	Rec.	KCounts	Zeta (mV)	StDev	Temp (°C)	Mob (µmcm)
Présure	1	2628.3	-32.7	97.0	25.0	-2.570
	2	2555.3	-32.0	92.8	25.0	-2.516
	3	2311.8	-31.9	1.577	25.0	-2.506
	4	2517.4	-31.7	104.6	25.0	-2.493
	5	3059.7	-33.4	91.8	25.0	-2.623
Cynarase	1	2342.6	-35.6	118.3	25.0	-2.796
	2	2017.8	-30.7	1.577	25.0	-2.412
	3	2225.8	-36.1	118.5	25.0	-2.833
	4	2410.3	-32.8	1.577	25.0	-2.574
	5	2073.1	-31.0	1.577	25.0	-2.435

En effet l'activité des ions calcium ionisé tend rapidement vers une stabilité électrique une fois que la maille caséinique est formée et tous les ions calcium sont occupés. Ce phénomène est observée lors de la préparation du fromage qui montre que le temps de prise et la formation du gel présure est plus rapide que celui du gel sous l'effet des extraits d'artichaut.

2. Propriétés sensorielles des fromages

2.1. Résultat du test de dégustation

L'analyse sensorielle consiste à analyser les propriétés organoleptiques des produits par les organes des sens, c'est une science multidisciplinaire qui fait appel à des dégustateurs et à leur sens de la vue, de l'odorat, du goût, du toucher et de l'ouïe pour mesurer les caractéristiques sensorielles et l'acceptabilité des produits alimentaires d'une façon objective (**Felix et Strigler, 1998**).

Les résultats du test d'évaluation des propriétés organoleptiques des fromages sont représentés dans le tableau suivant :

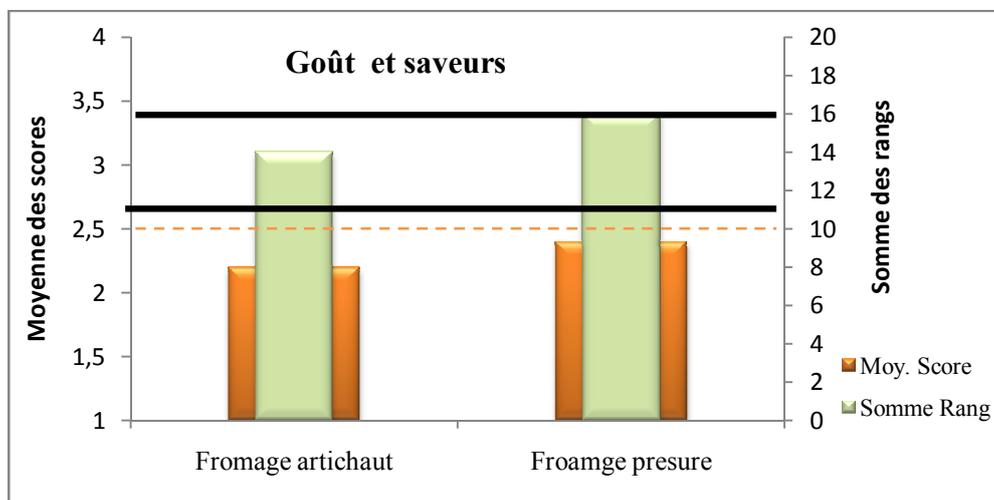
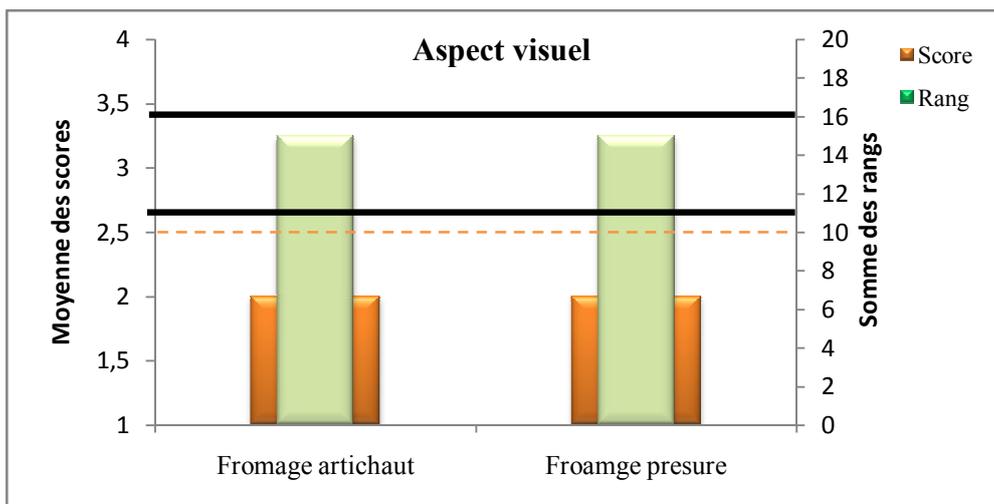
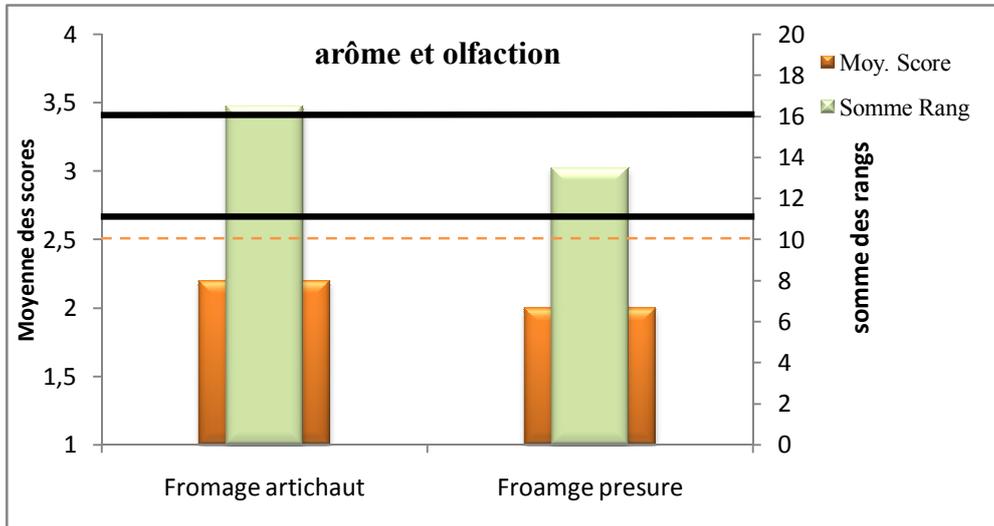
Tableau n°14: Tableau récapitulatif du test de dégustation (10 panelistes).

Critères / Echantillon	Aspect visuel		Olfaction et arômes		Gout et saveurs		Texture	
	S	R	S	R	S	R	S	R
Présure	2	15	2,4	16,5	2,4	16	2	14
Artichaut	2	15	2,2	13,5	2,2	14	2,2	16

S : score ; R : somme des rangs

Au vu des valeurs obtenues de la somme des rangs, l'ensemble des échantillons se retrouvent dans l'espace de l'intervalle **(11-16)** (**Figure n°25**). Statistiquement, aucune différence

significative n'est observée entre les fromages dégustés, à l'exception de l'échantillon presure qui présente un arôme significativement mauvais par rapport à l'échantillon artichaut avec une somme des rangs de 16,5. En revanche, un goût salé caractérise les fromages à bas d'extrait d'artichaut du probablement à la porosité de la pâte qui a absorbé plus de sel que la pâte presure.



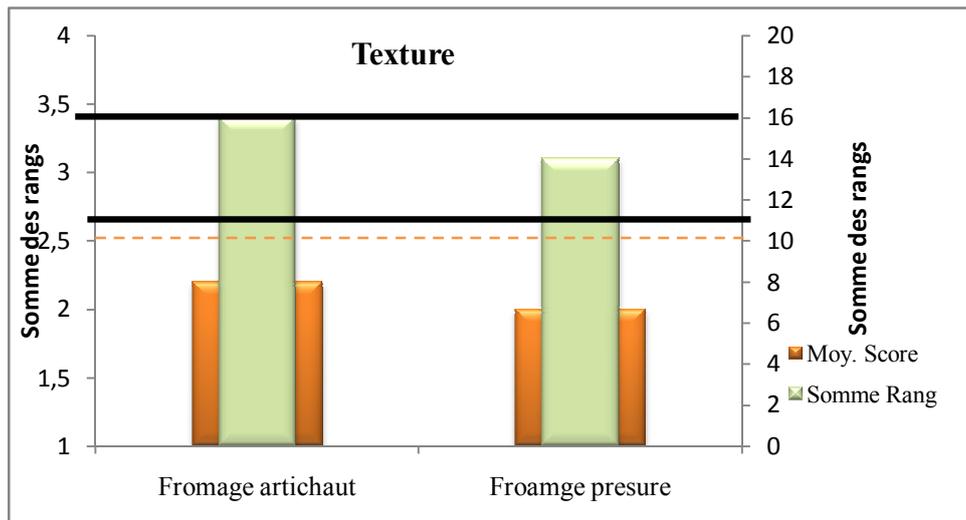


Figure n°25: Histogrammes d'analyse statistique des paramètres sensoriels (Aspect visuel, arôme et olfaction, Goût et saveurs, Texture) des fromages au seuil de probabilité de 5%. L'intervalle entre les traits pleins (**Somme des rangs compris entre 11 et 16**) indique une différence non significative. Le trait en pointillé est la limite acceptable (**Score de 2,5**).

III- Evolution des propriétés physicochimiques des fromages à pâte pressée non cuite au cours de la période d'affinage.

1. Variation de la température et de l'humidité durant l'affinage

La variation de la température et l'humidité relative de l'enceinte toute au long de l'affinage de notre fromage est représentée dans la **figure n°26**.

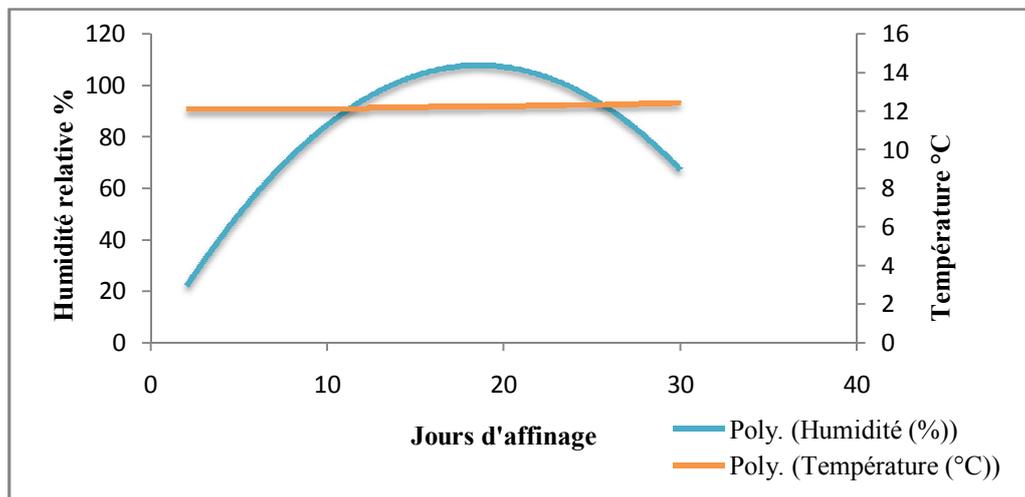


Figure n°26: Fluctuations de la température et l'humidité relative durant l'affinage.

La température et l'humidité sont des facteurs majeurs pour la croissance microbienne et l'activité enzymatique, elle influe aussi de manière directe sur l'affinage (**Ramet, 1997**). Ainsi une faible variation de ces deux paramètres peut affecter de façon considérable les caractères rhéologiques des fromages (**Martin et al., 1999 ; Dahl et al., 2002**). Dans notre

cas la température était pratiquement stable et dans l'intervalle convenable à l'affinage du fromage (10 à 12°C). Alors que l'humidité relative était très variable et parfois au dessous des normes (90- 95%), surtout durant la dernière semaine d'affinage. Ce qui explique que notre fromage était un peu dure après sa maturation, suite aux pertes d'eau des pâtes fromagères causées par la chute de l'humidité.

2. Evolution des caractères physico-chimiques du fromage au cours de l'affinage

Les résultats physico –chimiques des fromages aux cours de l'affinage sont représentés dans le **tableau n°15**.

Tableau n°15: Caractères physico-chimiques du fromage fabriqué avec la cynarase et la présure commerciale.

Analyses	pH		EST (g/L)		MG (g/L)		NaCl %	
	C	PR	C	PR	C	PR	C	PR
Avant affinage	4.86	4.90	44.84	47.29	17	15	2.30	2.53
1^{ere} semaine	4.80	4.86	45.60	46.45	17	15.5	2.34	2.56
2^{eme} semaine	4.97	5.03	41.65	50.41	17.2	16	2.36	2.58
3^{eme} semaine	5.02	4.92	50.87	51.87	17.5	16.2	2.38	2.6
4^{eme} semaine	4.98	4.91	55.62	63.46	18.8	17.6	2.4	2.7

C: fromage cynarase ;

PR: fromage Présure commerciale.

2.1.Variation du pH

La **figure n°27** reflète la variation du pH des deux types de fromage au cours de l'affinage. Le graphe montre que l'évolution des deux types de fromages au cours de l'affinage semble très comparable, ces résultats correspondent à ceux obtenus par **Shaojiang et al. (2003)** qui n'ont pas montré de différences significatives entre le pH des deux fromages.

Par ailleurs, nous notons que l'évolution du pH pour les deux types de fromages du j 0 à j+7, ces valeurs passent de (4.9) à (4.86) pour le fromage de présure commerciale et de (4.86) à (4.80) pour le fromage d'artichauts.

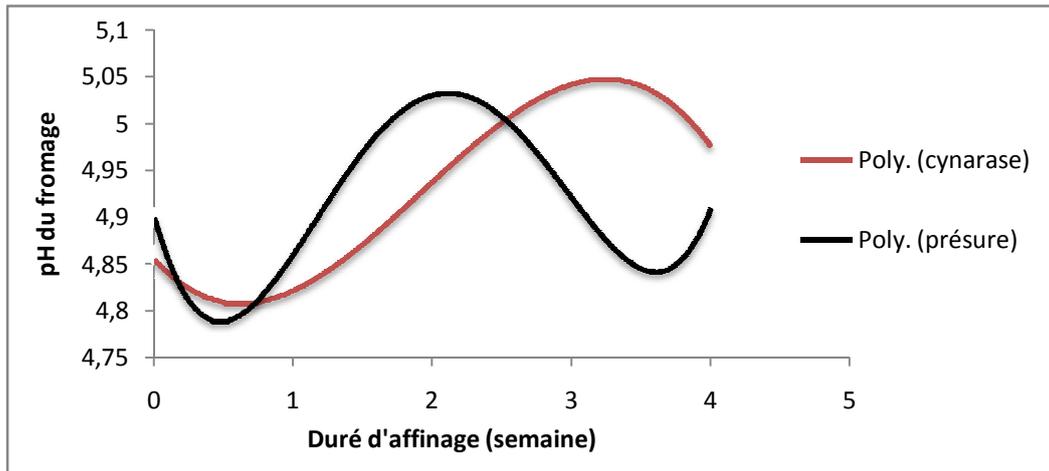


Figure n°27: Variation de pH des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.

Selon **Sanjuan *et al.* (1998)** cette diminution du pH est due à la bioconversion du lactose en acide lactique. Cette bioconversion commence lors de la coagulation et le pressage et croît rapidement durant les cinq premiers jours de l'affinage.

La remontée du pH j+7 à j+ 15 respectivement (5,03) pour le fromage de présure commerciale et (4,97) pour les fromages d'artichauts, est liée à la consommation de l'acide lactique par les levures, les moisissures et les bactéries de surface (**Leclercq-Perlat *et al.*, 2002**) et aussi à la production de l'ammoniac par suite de la désamination (**Sanjuan *et al.*, 2002**).

2.2.Variation de l'extrait sec total

Le taux de l'extrait sec total varie d'un type de fromage à un autre, dans de larges limites, et dépend d'une part de la composition initiale du lait et d'autre part de la manière dont sont effectués la coagulation et le pressage et l'égouttage.

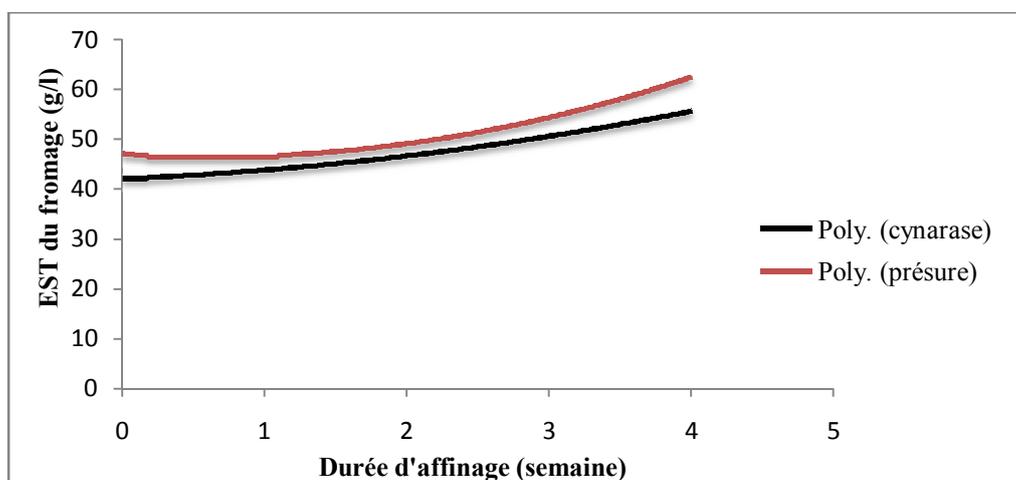


Figure n°28: Variation de l'extrait sec total des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.

D'après les résultats présentés dans la **figure n°28**, nous constatons une élévation de l'extrait sec total avec le temps de maturation. Ceci est dû à la perte d'eau par évaporation des fromages durant leur affinage et par action du sel qui joue un rôle sur le comportement hydrique (a_w) des fromages. Les valeurs passent de (47,29g/L) au 1^{er} jour à (63,46g/L) au dernier jour de l'affinage pour le fromage de Cynarase et de (44,84g/L) à (55,62g/L) pour le fromage à base de présure commerciale.

Selon **Nunez et al. (1991)**, le caillé à base d'extrait de fleurs d'artichauts donne lors du découpage des graines de caillé présuré, donc la quantité de lactosérum évacuée plus grande serait la cause de son extrait sec élevé, autrement dit les gels qui présentent la plus grande quantité de lactosérum exsudé auront des humidités moindres, c'est le cas du fromage d'artichauts. Ces résultats apparaissent en accord avec ceux obtenus par **Remeuf et al. (1989)**, qui ont signalé l'existence d'une corrélation négative très significative entre le volume de lactosérum exsudé et l'humidité du fromage.

2.3.Variation de la matière grasse

Les résultats expérimentaux obtenus montrent que l'évolution de la matière grasse des fromages obtenus par les préparations enzymatiques de la présure commerciale et de l'extrait coagulant d'artichauts présente des valeurs éloignées. L'augmentation des teneurs en matière grasse au cours de l'affinage est attribuée à la concentration des composants du fromage suite à la perte d'eau par évaporation (**Eck, 1990**).

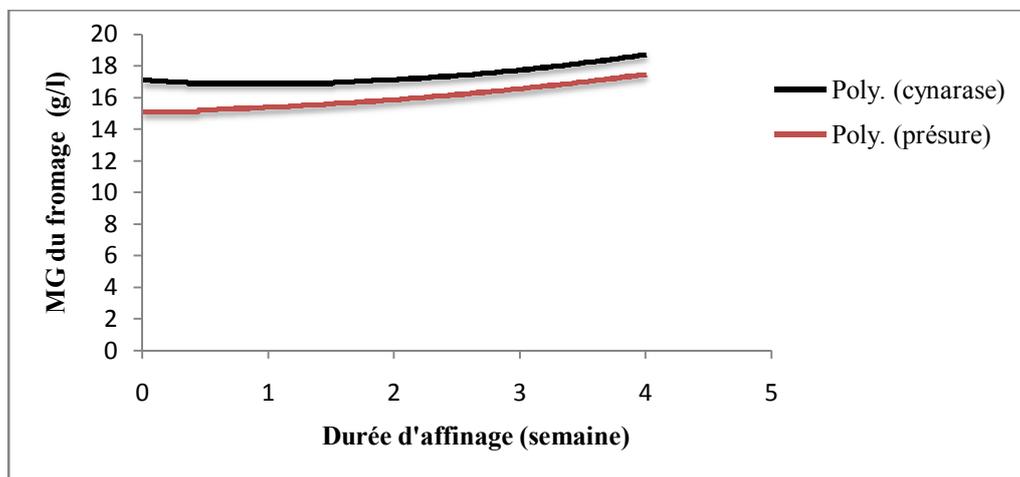


Figure n°29: Variation de la matière grasse des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.

En revanche, la matière grasse laitière est essentielle pour la texture et le développement de la flaveur des fromages (**Fréatin, 2016**), cela est dû à ses liaisons avec les autres constituants et aux transformations qu'elle subit au cours de l'affinage (**Vioque et al., 2000**).

En effet, les teneurs en matière grasse des deux fromages au dernier jour d'affinage sont inférieures aux normes de l'unité LFB de Boudouaou qui sont de 20% (**Figure n°29**).

2.4.Variation des teneurs en chlorure (NaCl)

La variation de la teneur en chlorure au cours de l'affinage est donnée par la **figure n°30**.

Les résultats montrent une augmentation significative de chlorure de sodium pour les deux fromages durant la maturation, cette élévation est due à la perte normale et progressive d'humidité durant la maturation (**Fox et al., 1999**).

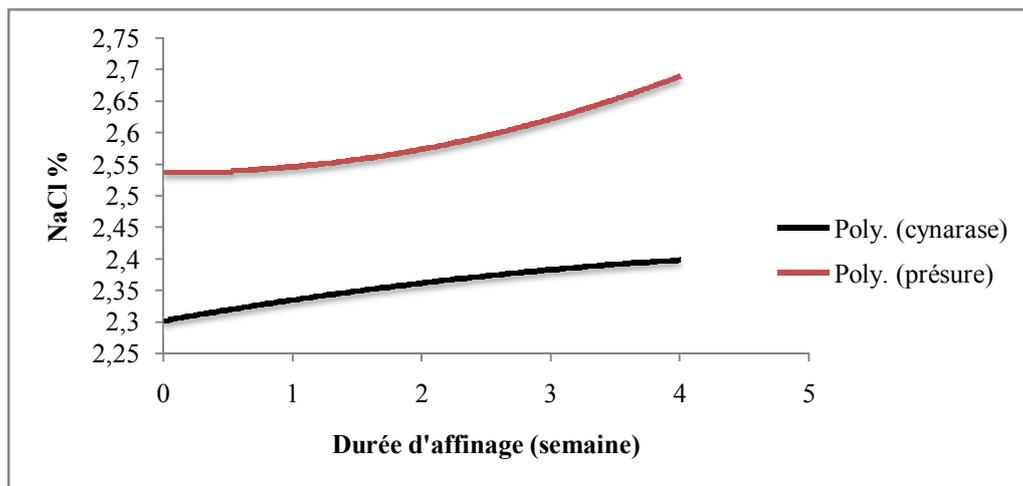


Figure n°30 : Variation de la teneur en chlorure (NaCl) des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.

Selon **Simal et al. (2001)**, l'augmentation de la teneur en NaCl dans le fromage entraîne une structure plus dense due à la diminution de l'hydratation des protéines en particulier les paracaséines, modifiant ainsi les interactions entre les constituants du caillé et donc sa structure.

2.5.Variation de l'azote total (Nt), l'azote soluble (Ns) et de l'azote non protéique (NNP) au cours de l'affinage

Les résultats des variations de l'azote total (Nt), l'azote soluble (Ns) et de l'azote non protéique (NNP) durant les quatre semaines d'affinage sont présentés dans le **tableau n°16**.

Tableau n°16 : Evolution des teneurs de l'azote total (Nt), l'azote soluble (Ns) et de l'azote non protéique (Nnp) durant l'affinage.

Analyses	Nt (g/100g de fromage)		Ns (g/100g de fromage)		Nnp (g/100g de fromage)	
	C	PR	C	PR	C	PR
Avant affinage	6.92	6.97	27.03	12.9	4.10	5.32
1ere semaine	6.99	7.13	33.01	15.01	5.84	6.10
2 ^e semaine	7.09	7.56	37.7	22.3	11.6	8.86
3 ^e semaine	7.14	7.36	41.2	27.2	10.4	14.6
4 ^e semaine	7.20	7.26	44.5	32.9	13.3	11.3

➤ **Evolution des teneurs en azote total durant l'affinage**

Les résultats du dosage de l'azote total par la méthode Kjeldhal montrent une évolution progressive des teneurs au cours de l'affinage (**tableau n°16**).

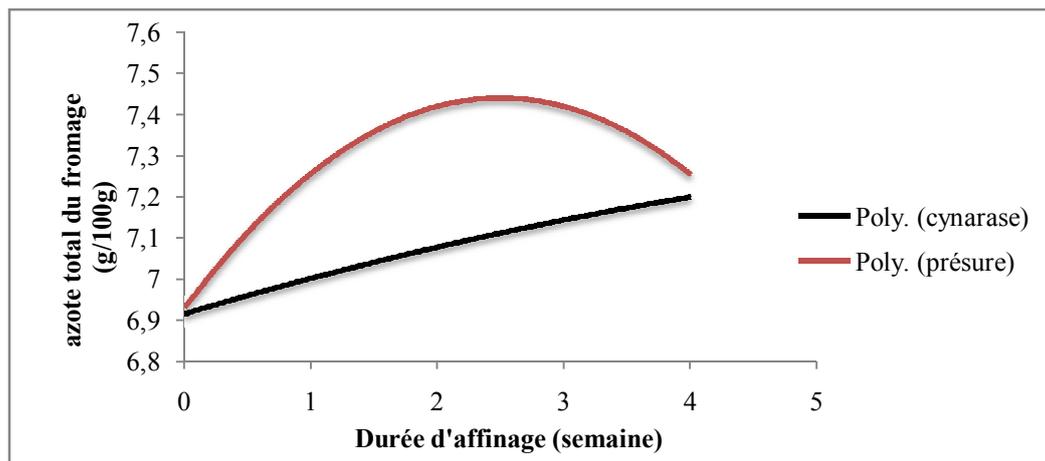


Figure n°31: Variation de la teneur en azote total (Nt) des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.

Ces teneurs en azote total passent de (6,92g/100g) le jour « 0 » à (7,20g/100g) au dernier jour de l'affinage pour le fromage à base de cynarase et de (6,97g/100g) le jour « 0 » à (7,26g/100g) au dernier jour d'affinage pour le fromage présure commerciale (**Figure n°31**).

Cette élévation des teneurs en azote total au cours de l'affinage des deux fromages est due essentiellement à la perte d'eau par évaporation durant la maturation ce qui entraîne la concentration des éléments constitutifs et donc la teneur en azote total (**Fernandez-Salguero et al., 2002**). Cependant, les teneurs en azote total dans les deux fromages ne diffèrent pas significativement quelque soit l'agent coagulant utilisé (**Shaojiang et al., 2003**).

➤ **Evolution des teneurs en azote soluble durant l'affinage**

La **figure n°32** présente l'évolution de la teneur en azote soluble des deux types de fromage durant la période d'affinage.

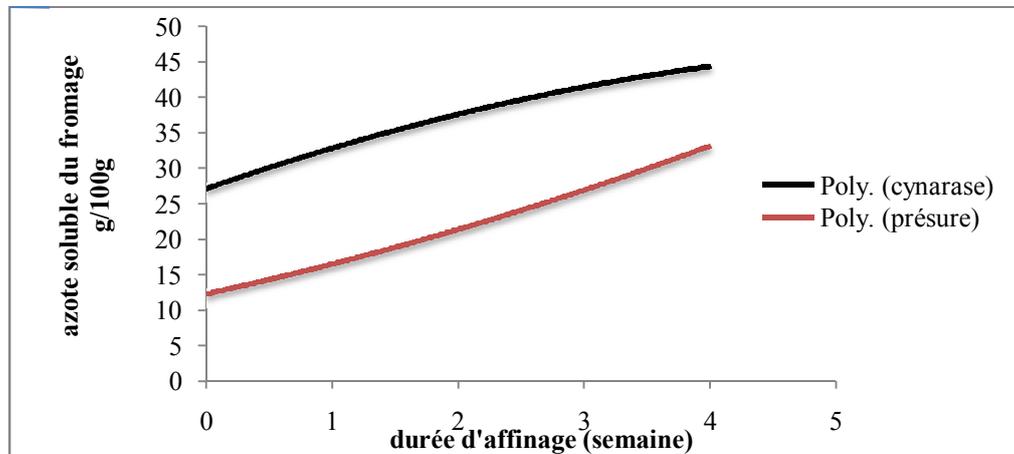


Figure n°32: Variation de la teneur en azote soluble (Ns) des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.

L'azote soluble est produit essentiellement par l'intermédiaire des enzymes coagulantes (Sousa et Malcata, 1996; Desmazeaud et Gripon, 1997), et à moindre degré de la protéinase du lait (Visser 1977; Kelly, 1999).

D'après la **figure n°32**, on note que la teneur en azote soluble est nettement plus supérieure dans le cas du fromage « *Cynara scolymus* » que dans celui du fromage « présure commerciale ». En effet, la protéolyse est nettement plus prononcée dans le cas des fromages « *Cynara scolymus* » que dans celui des fromages « présure commerciale » pendant toute la période étudiée. Ainsi, la protéolyse des deux coagulases augmente au fur et à mesure que la maturation avance.

➤ **Evolution des teneurs en azote non protéique durant l'affinage**

La **figure n°33** présente la variation de taux d'azote non protéique des deux fromages au cours de l'affinage.

Comme le montre la **figure n°33**, l'augmentation de l'azote non protéique est presque linéaire dans les deux types de fromages, les résultats indiquent que les valeurs de l'azote non protéique ont doublé de la fin de la première semaine au dernier jour de l'affinage en passant de (5,84) à (13,3) pour le fromage à base de cynarase et de (5,10) à (11,3) pour le fromage à base de présure commerciale. La même tendance a été observée par Roa *et al.* (1999).

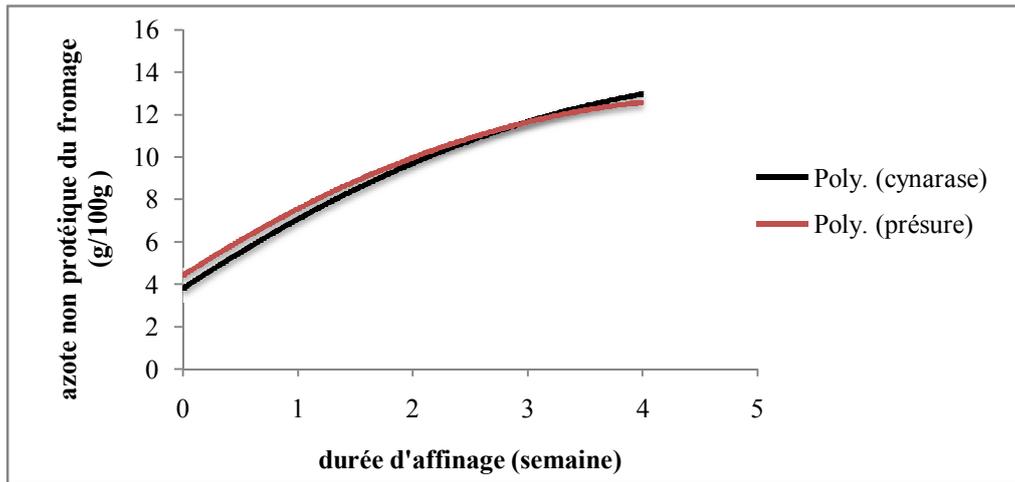


Figure n°33: Variation de la teneur en azote non protéique (Nnp) des fromages fabriqués avec la cynarase et la présure commerciale au cours de l'affinage.

Il faut noter aussi que la teneur en azote non protéique n'a pas été affectée par le type de coagulant car l'azote non protéique est principalement le produit de l'activité des cultures d'amorçage et des enzymes protéolytiques microbiennes qui se divisent en deux groupes :

- ✚ Les endopeptidases qui hydrolysent les protéines en libérant des peptides ;
- ✚ les exopeptidases (aminopeptidases, carboxypeptidases et dipeptidases) qui scindent les peptides en acides aminés (Venema *et al.*, 1987 ; Yvon *et al.*, 1989).

Plutôt que d'être des produits de l'activité protéolytique des enzymes coagulantes qui produisent principalement des polypeptides de grands poids moléculaire (Heimgartner *et al.*, 1990). L'azote non protéique contient des petits peptides de 2 à 20 résidus et d'acides aminés libres. Les teneurs en azote non protéique pour les fromages de *Cynara scolymus* étaient sensiblement plus élevées que dans les fromages «présure commerciale» ; bien que les bactéries lactiques et d'autres enzymes soient les principaux agents pour la production de l'azote non protéique (Esteves, 1995), mais la grande activité protéolytique de cynarase dans la dégradation des caséines fait que les fromages issus de celle-ci contiennent plus de substrat (polypeptides de caséine) pour produire un montant plus élevé d'azote à faible poids moléculaire (Carrera, 1999).

Conclusion

L'objectif de notre étude est de contribuer à une meilleure connaissance d'une protéase coagulant le lait, extraite à partir de fleurs d'artichaut (*Cynara Scolymus*).

L'étude menée sur cet extrait nous a permis d'évaluer les principales caractéristiques de l'enzyme à savoir, son activité coagulante, sa composition en protéine, sa purification par gel filtration, l'étude de l'effet des inhibiteurs sur l'activité enzymatique et la détermination de son poids moléculaire.

Le diagramme d'extraction que nous avons appliqué nous a permis d'avoir un extrait ayant les caractéristiques suivantes :

- ✚ Une force coagulante nettement inférieure à celle de la présure qui est de 127US et une activité protéolytique moyenne de 1,49.
- ✚ La purification de l'extrait enzymatique par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-50 après mesure des activités coagulantes des fractions actives suite à l'élimination d'une importante quantité de pigments colorés et de protéines contaminantes a permis de révéler un seul pic actif qui correspond à la totalité des fractions d'un volume de 25ml dotés d'une activité coagulante de 33 US, et d'un taux de protéines de 21µg/ml.
- ✚ Le profil électrophorétique montre que les enzymes présentes dans l'extrait sont deux polypeptides qui vraisemblablement deux sous unités de la Cynarase 1 et 2 avec des poids moléculaires respectifs de 36 et 26 kDa.
- ✚ Par ailleurs, l'étude de l'effet des inhibiteurs sur l'activité coagulant a montré la sensibilité de l'enzyme à un inhibiteur de 2-mercaptoethanol et un inhibiteur métalloprotéase (EDTA). Cette sensibilité était plus prononcée envers la Pepstatine-A qui a réussi à supprimer la totalité de l'activité coagulante de l'enzyme prononçant ainsi, une présence d'une Aspartyl protéase dans notre agent coagulant.

L'étude rhéologique, menée avec l'extrait enzymatique brut a permis de montrer l'évolution du caractère visqueux durant la phase d'emprésurage après formation du gel.

La viscosité atteint un maximum puis tend à diminuer lorsqu'une protéolyse générale s'installe et catalyse l'hydrolyse des différentes fractions caséiniques à savoir les caséines alpha et beta. Ainsi, la prise de gel chez la Cynarase est plus longue que chez la présure ce qui explique les valeurs élevées du potentiel zêta chez la Cynarase ($Z=33,34\text{mV}$) par rapport à la présure ($Z= 32,34 \text{ mV}$) et cela à cause des forces de répulsions électrostatiques élevées chez la Cynarase ce qui a induit à une fermeté moyennement meilleure chez le fromage à base de

présure. Ceci est confirmé par le test de dégustation ou les panelistes grand public et non professionnels n'ont observé aucune différence significative entre les 2 fromages à pâte pressée non cuite après appréciation des principaux caractères gustatifs et organoleptiques qui gèrent la qualité sensorielle d'un produit alimentaire.

Références bibliographiques

Abd El-Fattah A.F., El-Hawwary N.M. 1974. Studies on the production of milk clotting enzymes, proteolytic enzymes and mucilage by fungi. *J. Gen. Microbiol.* **84**, p.p.327– 331.

Abellan A., Pino A., Martínez-Cahe A., Salazar E., Tejada L., (2012). Free amino acid content of goat's milk cheese made with animal rennet and plant coagulant. *J. Sci. Food Agric.* **92**, p.p.1657–1664.

Abu-Reidah IM, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A., 2013. Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chem.*, **141**(3), p.p.2269-77.

AFNOR, 1986. Contrôle de la qualité des produits laitiers : analyses physicochimiques. Ed: 3. AFNOR, ITSV, 1030p.

Afsharnezhad M., Shahangian S. S., Sariri R, 2018. A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. *Biomac*.

Alais C., and Lagrange A., 1972. Etude biochimique d'une protéase coagulante produite par *Mucor miehei*. I. Activité coagulante et activité protéolytique. *Le Lait* **52**, p.p.407–427.

Alais C., 1984. Science du lait : principes des techniques laitières. Paris, Ed. Sepaic (4^e édition), 814p.

Alirezai M., Aminlari M., Reza Gheisari H and Tavana M., 2011. Actinidin: A promising Milk Coagulating Enzyme. *European Journal of Food Research & Review* **1**(2), p.p. 43-51.

Anusha R., Singh M. K. and Bindhu O. S., 2014. Characterization of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein, *Eur. Food Research and Technology*, **238**, p.p. 997-1006.

Badgujar S.B., Mahajan R.T., 2014. Nivulian-II a new milk clotting cysteine protease of *Euphorbia nivulia* latex, *International Journal of Biological Macromolecules*, **(70)**, p.p. 391-398.

Barbosa M., 1983. Cardo (*Cynara cardunculus*) as vegetable rennet. Report of the department of technologie for the food industry (D.T.I.A).5. communicações E conferencias- 45. Lab. of Engineeri. and Indus, *Tech.(LNETI)*, Lisbon, Portugal. 16p.

Barbosa M., Valles E., Vassal C., Mocquot G., 1976. L'utilisation de l'extrait de *Cynara cardunculus* comme agent coagulant en fabrication de fromage à pâte molle et à pâte cuite. *Le lait*, vol. **551**, p.p. 1-17.

Baron M. & Scott-Blair G.W., 1953. Rheology of cheese and curd. *In : Food-stuffs, their Plasticity, Fluidity and Consistency*. Scott-Blair, North Holland, Amsterdam.

Berridge N. J., 1952. An improved method of observing the clotting of milk containing rennin, *Journal of Dairy Research.*, **9**, p.p.328–329.

Bey N., Debbebi H., Abidi F., Marzouki M. N., Ben Salah A., 2018. The non-edible parts of fennel (*Foeniculum vulgare*) as a new milk-clotting protease source. *Industrial Crops and Products*, **112**, p.p.181–187.

Bruno, M.A., Pardo, M.F., Caffini, N.O., Lopez, L.M.I., 2002. Purification of a new endopeptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Acta. Farm. Bonaerensis*, **21** (1), p.p. 51-56.

Brutti, M.F., Pardo N.O., Caffini C.L., Natalucci., 2012. *Onopordum canthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT - Food Science and Technology*, **45**, 172-179

Bueno-Gavilá E., Cayuela J.M., Salazar E., Gómez R., Tejada L., 2020. Bioactivity of hydrolysates obtained from bovine casein using artichoke (*Cynara scolymus* L.) proteases. *Journal of dairy sciences*. Article in Press.

Carrera E., Gaya P., Medina M., Nunez M., 1999. Effect of milk coagulant on the formation of hydrophobic and hydrophilic peptides during the manufacture of bovine milk Hispanico cheese. *Milchwissenschaft*, Vol.54, p.p.146–149.

Cavalli Sandra Vairo Sofia V., Silva., Cecilia Cimino F., Xavier Malcata., Nora Priolo., 2008. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. *Food Chemistry*, **106**, p.p.997-1003.

Chazarra S., Sidrach I., Lopez-Molina D. and Rodriguez-Lopez J.N., 2007. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *Inter. Dairy J.I*, (17) p.p.1393–1400.

Cheftel J.C., Cheftel H., Besancon P., 1977. Laits et produits laitiers. In « Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments ». Paris, Ed. Tech. et Doc. Lavoisier, 801p.

Chen S., Zhao J., Agboola S., 2003. Isolation and partial characterization of rennet-like proteases from Australian cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, p.p.3127- 3134.

Christen C., Virasoro E., 1935. Présures végétales, extraction et propriétés, *Le lait*, vol. **15**, p.p. 355-358.

Dahl S., Tavaría F., Malcata F., 2002. Relationships between flavor and microbiological profiles in Serra da Estrela cheeses throughout ripening. *International Dairy Journal*. Vol.**10**, p.p.255-262.

Desmazeaud M.J., Gripon J.C , 1997. General mechanism of protein breakdown during cheese ripening, *Milchwissenschaft*, **32**, p.p. 731-734.

Ding Z., Liu S., Gu Z., Zhang L., Zhang K and Shi G., 2011. Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran. *African Journal of Biotechnology*, **10** (46), p.p. 9370-9378.

Dubey V.K., Jagannadham M. V., 2003. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*, *Phytochemistry*, (62) ,p.p. 1057–1071.

Eck, 1990. Le fromage. Paris, Ed. Tech. et Doc. Lavoisier (2e édition), 539p.

Edward A., 1986. A biologist's guide to principles and techniques of practical biochemistry. Edition USA. (3e édition), p.p. 186-254.

Egito A.S, Girardet J.M, Laguna L.E, Poirson C, Molle D, Mielo L, Humbert G. and Gaillard J.L., 2007. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein, *International Dairy Journal*, 17, p.p.816–825.

Esposito M., Di Pierro P., Dejonghe W., Mariniello L., Porta R. 2016. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. *Food Chemistry* 204, p.p. 115–121.

Esteves C., 1995. Estudo comparativo das características bioquímicas dos coalhos de *Cynara cardunculus* L., *Cynara scolymus* L., e *Cynara humilis* L. thèse Magister, Université de Coimbra, Portugal,

Felix et Strigler, 1998. Evaluation sensorielle : manuel méthodologique. Lavoisier, Paris.

Fernandez-Salguero J., Tejada L., Gomez R., 2002. Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 82, p.p. 464 – 468.

Fox P.F. and Whitaker J.R., 1977. Isolation and characterizations of sheep pepsin. *Biochemistry Journal*, 161, p.p. 389 – 398.

Fox P.F., Law J., McSweeney P.L.H., Wallace J., 1999. Biochemistry of cheese ripening. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Chapman & Hall. (2^e edition), London, Vol. 1, p.p. 389- 438.

Freni K., Tavarria M., Joséâ Sousa F., Xavier Malcata., 2010. Storage and lyophilization effects of extracts of *Cynara cardunculus* on the degradation of ovine and caprine caseins. *Food Chemistry*, 72, p.p.79-88.

Frétin M., 2016. Construction de la qualité sensorielle des fromages de type Cantal : rôle des interactions entre les communautés microbiennes et la composition de la matière grasse laitière des fromages. Thèse doctorat. Univ. Blaise Pascal, 224p.

Gagaoua M., Hoggas N., Hafid K., 2015. Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale* Roscoe rhizomes, *International Journal of Biology Macromolecular*, (73) p.p.245-252.

Gagaoua M., Ziane F., Nait Rabah S., Boucherba N., Ait Kaki El-Hadef El-Okki A., Bouanane-Darenfed, A., & Hafid, K., 2017. Three phase partitioning, a scalable method for the purification and recovery of cucumisin, a milk-clotting enzyme, from the juice of *Cucumis melo var. reticulatus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, p.p.515-525.

Garnot P., Martin P., 1979. La présure, composition. Activité, son rôle en fromagerie. La Tech. Laitière, Vol. 930, n.3, p.p. 27- 30.

He X., Ren F., Guo H., Zhang W., Song,X., and Gan B.,2010 . Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced By *Bacillus amyloliquefaciens* D4, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28 (1), p.p.203-208.

Heimgartner U., Pietrzak M., Geertsen R., Brodelius P., Da Silva Figueredo, A., Pais M., 1990. Purification and partial characterization of milk-clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29, p.p.1405-1410.

Hurtaud C., Rulquin H., V.Rit. R., 1993. Effect of infused volatile fatty acids and caseinate on milk composition and coagulation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **76**, p.p.3011-3020.

Hurtaud C., Peyraud J.L., Michel G., Berthelot D., Delaby L., 2009. *Animal*, **3**, p.p.1327-1338.

Javier Solorza-Feria, Guadalupe Méndez-Montecalvo, Rosalía González-Soto, Perla Osorio-Díaz, Alfredo Jiménez-Pérez., 2011. Changes in the apparent viscosity profiles of casein suspensions as affected by plant enzymes. *Food Science and Technology*, **44**, p.p.414- 420.

Johnson, M. E., Cen, C. M., & Jaeggi, J. J., 2001. Effect of rennet coagulation time on composition, yield, and quality of reduced-fat cheddar cheese. *Journal Dairy of Sciences*, **84**, p.p.1027-1033

Kahlouche A. and Nouani A., 2017. Characterization of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus mojavensis* P47M strain isolated from Algerian dairy farm soil . *Research. Journal of Biotechnology*, **12 (12)**, p.p. 37-45.

Katsaros G.I., Tavantzis G., Taoukis P.S., 2010. Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator, *Innov. Food Science and Emerging Technologies*, **11**, 47–51.

Kelly A.L., 1999. The influence of heat treatment of milk on proteolysis in Cheddar cheese during ripening, *Milchwissenschaft*, Vol.**54**, p.p. 682–685.

Kfoury, M. Mpagana, J. Hardy (1988). Influence de l'affinage sur les propriétés rhéologiques du camembert et du saint-paulin. *Lait* ,**69** (2), p.p.137-149.

Kramer A., 1960. A rapid method for determining significance of differences from rank sums. *Food technology*, Vol.**14**, p.p.576-581.

Kumari Narwal R., Bhushan B., Pal A., Panwar A. and Malhotra S., 2016. Purification, physico-chemico-kinetic characterization and thermal inactivation thermodynamics of milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422, *LWT - Food Science and Technology*, **65**, 652.

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680.

Leclercq-perlat M., Bruno F., Lambert D., Latrille E., Spinnler H., Corrieu G., 2002. Controlled production of Camembert-type cheese. Part I : *microbiological and dairy research*, submitted, p.p.41-47.

Lenoir J., Veisseyre R., Herinier J., Mocquot G., Bret G., Galzin M., Ardin F., 1971. Le fromage. *Le lait*, vol.**135**, p.p. 503-504.

Llorente B.E., Brutti C.B., and Caffini N.O., 2004. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52**, (26), p.p.8182-8189.

Llorente B.E., Obregon W.D., Aviles F.X., Caffini N.O., Vairo-Cavalli S., 2014. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: characterization of aspartic proteases. *Food Chemistry*, **159**, p.p.55-63.

Lo Piero A.R. , Petrone G. , Puglisi I. , 2002. Characterization of « lettucine », a serine_ like prottease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk-clotting. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50** (8), p.p. 2439-2443.

- Lowry O.M., Rosebrough N.J., Farr A.L., Et Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*. **193**, p.p.265-275.
- Luo, J., Xiao, C., Zhang, H., Ren, F., Lei, X., Yang, Z., & Yu, Z., 2018.** Characterization and milk coagulating properties of *Cynanchum otophyllum* Schneid. proteases. *Journal of Dairy Science*, **101**(4), p.p.2842–2850.
- Majumder R., Banik S.P., and Khowala S. 2015.** Purification and characterisation of kappa-casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091, *Food chem.* **173**, 441p.
- Martin A.P.L., Vasconcelos M.M.P., Sousa R.B., 1996.** Thistle (*Cynara cardunculus* L.) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. *Le Lait*, **76**, p.p.473- 477.
- Mekhaneg B., Girardet J.-M., Humbert G., Saulnier F., Poirson C., Bellal M.M., 2018.** Physico-chemical characterization of a milk-clotting fraction extracted from turkey (*Meleagris gallopavo*) proventriculus. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.
- Moschopoulou E.E., Kandarakis I.G., Alichanidis E., Anifantakis E.M., 2006.** Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. *Journal of Dairy Research*, **73**, p.p.49–57.
- Nadaroglu H., Nazan D., 2012.** Purification and characterization of a novel protease compositain from compositae (*Scorzonera hispanica* L.), *European Food Research and Technology*, **234**, p.p.945-953
- Nouani A., Morsli A., Dako E., Belhamiche N., Belbraouet S., Bellal M.M., 2009.** Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *Journal of Food Technology*, **7** (1), p.p.20-29.
- Núñez M., Fernández-del-Pozo B., Rodríguez- Marin M.A., Gaya, P., Medina M., 1991.** Effect of vegetable and animal rennet on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *Journal of Dairy Research*, **58**, p.p. 511-519.
- Oliveira A., Pereira C., Soares da Costa D., Teixeira J., Fidalgo F., & Pereira S. 2010.** Characterization of aspartic proteinases in *C. cardunculus* L. callus tissue for its prospective transformation. *Plant Science*, **178**, p.p.140–146.
- Ordiales E., Martín A., Jose Benito M., Hernandez A., Ruiz-Moyano S., de Guia Cordoba M., 2013.** Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “Torta del Casar” cheesemaking. *Food Chemistry*, **133**, p.p.227-235.
- Park Y.W., Juarez M., Ramos M., And Haenlein G.F.W., 2007.** Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68**, p.p.88–113
- Pontual E V., Carvalho B.E.A., Bezerra R. S., Coelho L.C.B.B., Napoleão T. H., Paiva P. M.G., 2012.** Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. *Food Chemistry*, **135**, p.p. 1848–1854.
- Rajagopalan A., Sukumaran B.O., 2018.** Three phase partitioning to concentrate milk clotting proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br and its characterization, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol.**118** p.p. 279-288.

Ramet J. P., 1997. Technologie comparée de l'affinage des différents types de fromages. In « le fromage » ECK A., Tech. et Doc. Lavoisier, p.p. 42- 61.

Remeuf F., Pellegrini O., Rivernal M., 1989. Evolution des caractères physico-chimiques et des paramètres de coagulation du lait de brebis collecté dans la région de Roquefort, Le lait, Vol. 74, p.p. 448- 468.

Roa I., López M.B., Mendiola F.J., 1999. Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese, *Food Research International*, **32**, p.p. 413-419.

Sales-Gomes M., Lima-Costa M.E., 2008. Immobilization of endoproteases from crude extract of *Cynara cardunculus* L. flowers. *Food Science and Technology International*, **14**, p.p.271-276.

Sanjuan E., Saavedra P., Millan R., Castelo M., et Fernandez-Salguero J., 1998. Effect of the ripening time and the type of rennet on the mineral content of Los Pedroches cheese. *Journal of Food Quality*, Vol.21, p.p. 187–200.

Sanjuan E., Millan R., Saavedra P., Carmona M., A., Gomez R., Fernandez-Salguero J., 2002. Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chemistry*, Vol. **78**, p.p. 281-289.

Shaojiang C., Samson A., Zhao J., 2003. Use of Australian cardoon extract in the manufacture of ovine milk cheese – a comparison with commercial rennet preparations. *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. **38**, p.p. 799–807.

Shieh C.J., Phan Thi L.A. and Shih I.L. 2009. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto, *Biochem. Engineering Journal*, **43**, 85p.

Sidrach L., Garcia-Canovas F., Tudela J. and Neptuno Rodriguez-Lopez J., 2005. Purification of Cynarase from artichoke (*Cynara scolymus*) enzymatic properties of Cynarase A, *Photochemistry*, **66**, p.p. 41-49.

Silva S.V. and Malcata F.X., 2002. Comparative catalytic action of two microbiological proteinases upon caprine caseins in solution, *Food Chemistry*, **71**, p.p. 207-214.

Silva B. L., Geraldés F. M., Murari C. S., Gomes E. and Da-Silva R. 2014. Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, *Applied biochemical and biotechnology*, **172**, 1999.

Simal S., Sanchez E., Bon J., Femenia A., Rossello C., 2001. Water and salt diffusion during cheese ripening: effect of the external and internal resistance to mass transfer. *Journal of Food Engineering*, **48**, p.p.269-275.

Sousa M.J., Malcata F.X., 1996. Influence of pasteurization of milk and addition of starter cultures on protein breakdown in ovine cheeses manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus*, *Food Chemistry*, **57**, p.p. 549-556.

Souza P. M., Werneck G., Aliakbarian B., Siqueira F., Ferreira Filho E. X., Perego P., Junior A. P. 2017. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, **109**, p.p.1103-1110.

Tsouli J., 1979. Etude d'une protéase coagulante extraite de *Cynara scolymus* et de *Cynara cardunculus*, adaptation à la méthode conductimétrique pour la détermination du temps de coagulation du lait et le contrôle des fabrications, *Thèse de doctorat, C. Bernard*. Lyon, 62p.

Vaudeweghe J., 1997. Le rendement en fromage : prédétermination et mesure, In « Le fromage ». Paris, Ed. Tech. et Doc. Lavoisier (3e édition), p.p.791-801

Venema D.P., Herstel H. , Elenbaas H.L., 1987. Determination of the ripening time of Edam and Gouda cheese by chemical analysis. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, Vol. **41**, p.p. 215–226.

Verissimo, P.; Faro, C.; Moir, A.; Lin, Y.; Tang, J.; Pires, E., 1996. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *Eur. J. Biochem.* **235**, p.p.762-768.

N. Vétier, S. Banon, J.P. Ramet, J. Hardy., 2000. Hydratation des micelles de caséine et structure fractale des agrégats et des gels de lait. *Lait* **80**, p.p.237–246

Vioque M., Gomez R., Sanchez E., Mata C., Tejada L., Fernandez-Salguero J., 2000. Chemical and microbiological characteristics of ewes_ milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* L. and *Cynara humillis* as coagulants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 48, p.p. 451–456.

Visser F.M.W., 1977. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. Protein breakdown: analysis of the soluble nitrogen and amino acid nitrogen fraction, *Netherland Milk Dairy Journal*, **31**, p.p. 210- 239.

Walde P., Iusi P.L., Palmieros S., 1984. Activité protéolytique des graines de tournesol. *Journal of agriculture food chemistry*, vol.**32** (2), p.p.322-329.

Yvon M., Chabanet C., Pelissier J.P., 1989. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. *International Journal of Peptide and Protein Research*, Vol.**34**, p.p.166–176.

Chapitre II : Purification et caractérisation d'une protéase d'origine microbienne (*Mucor circinelloides* SF15) et évaluation des propriétés rhéologiques d'un fromage fondu.

Introduction

Ces dernières années, de très nombreux travaux sont portés sur la recherche de protéase d'origine fongique (**Merheb-Dini et al., 2010; Yegin et al., 2010 ; Alves et al., 2013**) qui au plan pilote, ont donné très tôt des résultats souvent comparables et parfois supérieurs à ceux obtenus avec la présure, et ont été rapidement validés en fabrication industrielles. En effet, les microorganismes utilisent divers substrats comme source d'éléments nutritifs pour la croissance et les activités métaboliques. Dans le cas de la fermentation immergée, le microorganisme sécrète les enzymes nécessaires à la dégradation des molécules de substrat disponibles afin de répondre à leurs besoins nutritionnels. Ces procédés sont généralement plus simples et peuvent utiliser des déchets ou des substrats agro-industriels tels que le tourteau de soja dégraissé, le son de blé, le son de riz, les déchets de banane, etc., pour la production d'enzymes (**Rajagopalan et Krishnan, 2009**).

Matériel et méthodes

I- Matériel biologique

1. Méthode d'isolement de la souche

La souche identifiée comme *Mucor circinelloides* dénommée SF15 est une souche locale isolée par l'équipe de recherche du département de technologie alimentaire de l'université de Boumerdes. La terre utilisée pour la recherche des microorganismes a été prélevée à proximité de la laiterie fromagerie de Boudouaou précisément aux alentours de local contenant les sacs de poudre de lait. 100 à 150 grammes sont pris à des profondeurs variant entre 3 et 15 cm à l'aide d'une spatule stérile et stockés dans des contenants stériles. Les échantillons de terre sont tamisés puis 10g de terre tamisés sont pesés, broyés le plus finement possible afin de libérer au mieux les microorganismes. La terre est transférée dans une fiole de 100ml complétée avec de l'eau physiologique stérile. Le mélange est ensuite homogénéisé pendant 20 minutes sous agitation magnétique (**Davet et Rouxel, 1997**). Nous obtenons ainsi une dilution de 1/10. Le milieu de culture utilisé est le Sabouraud- chloramphénicol dans lequel est ajouté 10% de lai écrémé UHT. Le milieu de culture utilisé est coulé en boîte de Pétri puisensemencés (pour les dilutions 10^{-3} à 10^{-9}) par étalement de 0,1 ml de chaque

dilution à l'aide d'un râteau à la surface de milieu. L'incubation a lieu à 25°C pendant 3 à 4 jours.

2. Identification de la souche SF15

L'identification de la souche par le produit de PCR a été examinée par électrophorèse, purifiée, puis séquencée par Geno-screen (Campus de l'Institut Pasteur de Lille, France). En plus de l'identification biochimique et morphologique, le gène rADN 18S a été amplifié avec succès à partir de l'ADN génomique de la souche SF15 (**figure n°39**). La base de données nucléotidique a montré une homologie à 99% avec la souche de *Mucor circinelloides*. Par conséquent, notre souche a été désignée *Mucor circinelloides* SF15 avec le numéro d'accès (accession number) **MH368140** et les bases de données nous ont permis d'élaborer un dendrogramme phylogénétique pour SF15 et des souches apparentées (**Figure n°40**).

3. Obtention de l'enzyme brut à partir de la culture de la souche de *Mucor circinelloides* SF15 par fermentation en milieu solide

3.1. Repiquage de la souche *Mucor SF 15*

Le repiquage de la souche *Mucor SF 15* est réalisé en faisant un repiquage de la boîte gélosée contenant la souche sur milieu PDA dans les conditions d'asepsie. L'ensemencement est réalisé à l'aide d'une anse de platine stérile et les boîtes de pétri sont incubées à la température de 35°C pendant 5 jours. Ce repiquage permet entre autres de revivifier la souche conservée.

3.2. Préparation de l'inoculum

Après incubation, les spores formées sont libérées à l'aide d'une solution diluée de tween 80 (0,01%) en grattant légèrement la surface de la gélose à l'aide d'une anse afin de mettre en suspension les spores. L'inoculum est filtré à travers un papier filtre, la solution est récupérée dans un pot stérile.

3.3. Préparation du milieu de fermentation

Le milieu de fermentation utilisé est de type solide en utilisant le son de blé comme matière première (**Rao et Mathur, 1976 ; Merheb-Dini et al., 2010 ; Majumder et al., 2015**).

30g de son de blé broyé sont mélangés à 60ml d'une solution à 0.01% de sulfate d'ammonium et 1g de poudre de lait de type Low heat. Les flacons contenant les milieux sont bouchés avec du coton cardé, enveloppés dans un filet de gaze et recouverts de papier aluminium pour assurer la bonne étanchéité puis stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

3.4. Inoculation des milieux de fermentation et extraction de l'enzyme brute

a- La fermentation

Devant un bec bunsen, introduire dans chaque flacon contenant le milieu de fermentation, 10ml d'inoculum, puis incuber à 30°C pendant 5jours.

b- Extraction de l'enzyme brut

Après 5 jours d'incubation, la formation des spores est remarquée à la surface des milieux, on ajoute alors 50ml d'eau distillée stérile. A l'aide d'un agitateur magnétique, on procède à l'agitation des erlenmeyers pendant 20min suivi d'une filtration sur une bande à gaze. Le filtrat est soumis à une centrifugation à la température de 4°C à 12000 trs / min pendant 20min. Les surnageant sont récupérés et conservés à 4°C pour la détermination des différents paramètres de l'extrait enzymatique brut.

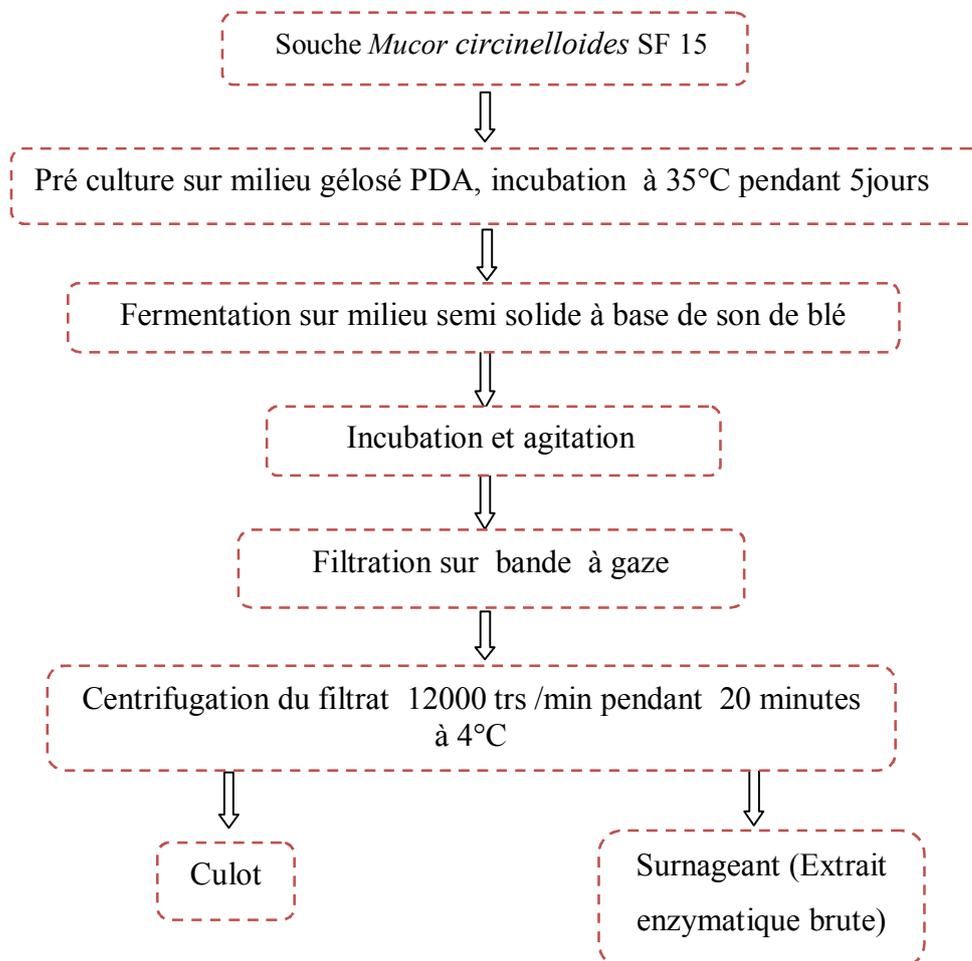


Figure n°34: Etapes d'obtention de l'extrait enzymatique brut de *Mucor* SF 15.

4. Purification partielle par fractionnement au sulfate d'ammonium de l'extrait enzymatique brut

L'enzyme coagulant le lait dans l'extrait brut a été précipitée entre 40-80% de saturation de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Annexe II.2). Le précipité obtenu après centrifugation à 10 000 g à 4 ° C pendant 20 min a été mis en suspension dans du tampon acétate (0,01 M, pH 5,5) et dialysé pendant une nuit contre des changements répétés du même tampon.

5. Chromatographie d'exclusion moléculaire sur colonne semi préparative

Pour la purification partielle de notre extrait enzymatique brut, notre choix s'est porté sur le sephadex G-50 dont le domaine de fractionnement est compris entre 3 et 80 KDa. Le gel gonflé est coulé dans une colonne de type pharmacia (1,5x30 cm) et calibré par un tampon acétate de sodium (0,1M ; pH 5,2). Un volume aliquote de 5 ml d'échantillon est élué avec le tampon acétate de sodium à un débit de 0,93 ml/min. les éluâts sont recueillis dans un collecteur de fraction à raison de 3ml/tube et sur chaque fraction l'absorbance (280nm) et les activités coagulantes sont déterminées. Les fractions actives (volume total) sont récupérées.

II- Caractérisation de l'extrait enzymatique de *Mucor circinelloides* SF15

1. Mesure de l'activité coagulante (Méthode Cf. chapitres précédents, Voir page 40).

2. Détermination de l'activité protéolytique

Cette mesure est déterminée selon la méthode décrite par Murado *et al* (1993) (voir Annexe II.1).

3. Taux de protéines

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants est réalisé selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) (voir Annexe I.3).

4. Détermination de l'indice AC/AP (Méthode Cf. chapitres I, voir page 41).

5. Caractérisation de l'enzyme commerciale

➤ Force coagulante

A partir de la fiche technique fournie par l'unité de fabrication de l'EDAM de la LFB (Boudouaou), la présure qui nous a été aimablement remis, titre une force coagulante de 1800U/g. C'est une présure en poudre d'origine microbienne d'*Aspergillus Niger var. Awamori* (100% Chymosine).

➤ Dilution

La présure commerciale a été diluée dans une solution de NaCl à 5% pour mettre son utilisation dans les conditions de laboratoire. 100mg de présure sont dissous dans 100 ml de solution de NaCl à 5%. Cette solution est titrée à 1mg /ml de présure.

III- Préparation des échantillons d'enzymes par coupage enzyme commerciale /enzyme *Mucor circinelloides* SF15.

1. Pourcentage de coupage

Les solutions enzymatiques sont préparées par coupage entre la présure commerciale et l'extrait pré purifié de *Mucor* SF15 selon le tableau suivant (**Tableau n°17**):

Tableau n°17 : Préparation des solutions coagulantes.

Présure	Volume de présure	Extrait <i>Mucor</i> SF15	Volume de l'extrait
100%	10 ml	100%	5 ml
50%	10 ml	50%	5 ml
60%	12 ml	40%	4 ml
80%	16 ml	20%	2 ml

IV- Préparation de la pâte à fromage

1. Origine et physicochimie du lait

➤ Provenance du lait

Le lait de vache utilisée dans la fabrication de la pâte à fromage provient d'une exploitation agricole d'élevage située dans la commune de *Souk el had* (Wilaya de Boumerdes).

Méthodes analytiques

Toutes les méthodes analytiques employées sont décrites dans le recueil des normes **AFNOR (1986)** :

a- pH

Cette méthode décrit la mesure électro métrique du pH. Elle s'applique aux laits et aux fromages.

b- Densité

Elle est déterminée à l'aide d'un lactodensimètre (**Voir Annexe I.5**).

c- Extrait sec total

Il est déterminé par étuvage du lait à 102°C pendant 3 heures selon le protocole suivant :

5 ml de lait sont mis à sécher dans une étuve réglée à 102°C. A Chaque 1 heure d'étuvage, le poids de la capsule est déterminé. Cette opération est refaite plusieurs fois jusqu'à poids constant. Cette manipulation permet de déterminer l'humidité du lait (teneur en eau).

Le taux d'extrait sec (%) correspond à : **100-H%**.

d- Détermination de la teneur en matière grasse (Méthode acido-butyrométrique de Gerber) (**Annexe I.5**).

e- Acidité (Méthode Cf. *chapitres I*) (**Voir Annexe I.5**).

2. Méthodes de préparation de la pâte à fromage

L'objectif de la préparation de la pâte à fromage consiste d'une part à déterminer les aptitudes à la coagulation de l'extrait enzymatiques de *Mucor* SF15 et d'autre part d'apprécier la qualité du fromage fondu fabriqué par coupage avec le cheddar.

La pâte à fromage préparée dans le but de l'intégrer dans la fabrication du fromage fondu en remplacement partiel du Cheddar, a été fabriquée selon la technologie de fabrication du fromage EDAM. Cependant, il faut souligner que le procès adopté par la LFB a supprimé un certain nombre d'étapes par rapport au procès de l'EDAM.

Ces essais ont été réalisés au niveau du laboratoire suivant le procédé pratiqué au niveau de l'unité LFB de Boudouaou, en respectant les conditions de fabrication industrielle ainsi que l'emploi des mêmes ingrédients (**figure n°35**).

3. Etapes de fabrication fromagère

➤ Traitement du lait

La quantité du lait utilisée pour la fabrication fromagère est de 10 litres. La pasteurisation est réalisée dans un bain marie à 80°C pendant 1 mn après ajout de CaCl₂ à raison de 1g/l. Ce traitement va permettre de réduire la flore banale et d'éliminer la flore pathogène. Le lait est ensuite refroidi à 38°C.

➤ Ensemencement du lait traité

La maturation du lait est réalisée par ajout de ferments lactiques mésophiles. Ces ferments sont des cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques qui se multiplient dans le lait et dans les fromages, assurent deux fonctions essentielles :

Abaisser le pH du milieu en transformant le lactose en acide lactique et contribuer aux caractères organoleptiques des fromages en libérant des systèmes enzymatiques. Les ferments mésophiles titrés à 200U proviennent de l'unité LFB de Boudouaou. Ils sont ajoutés par ensemencement direct à raison de 10 mg/10 litres de lait, avec un brassage jusqu'à dissolution complète des ferments.

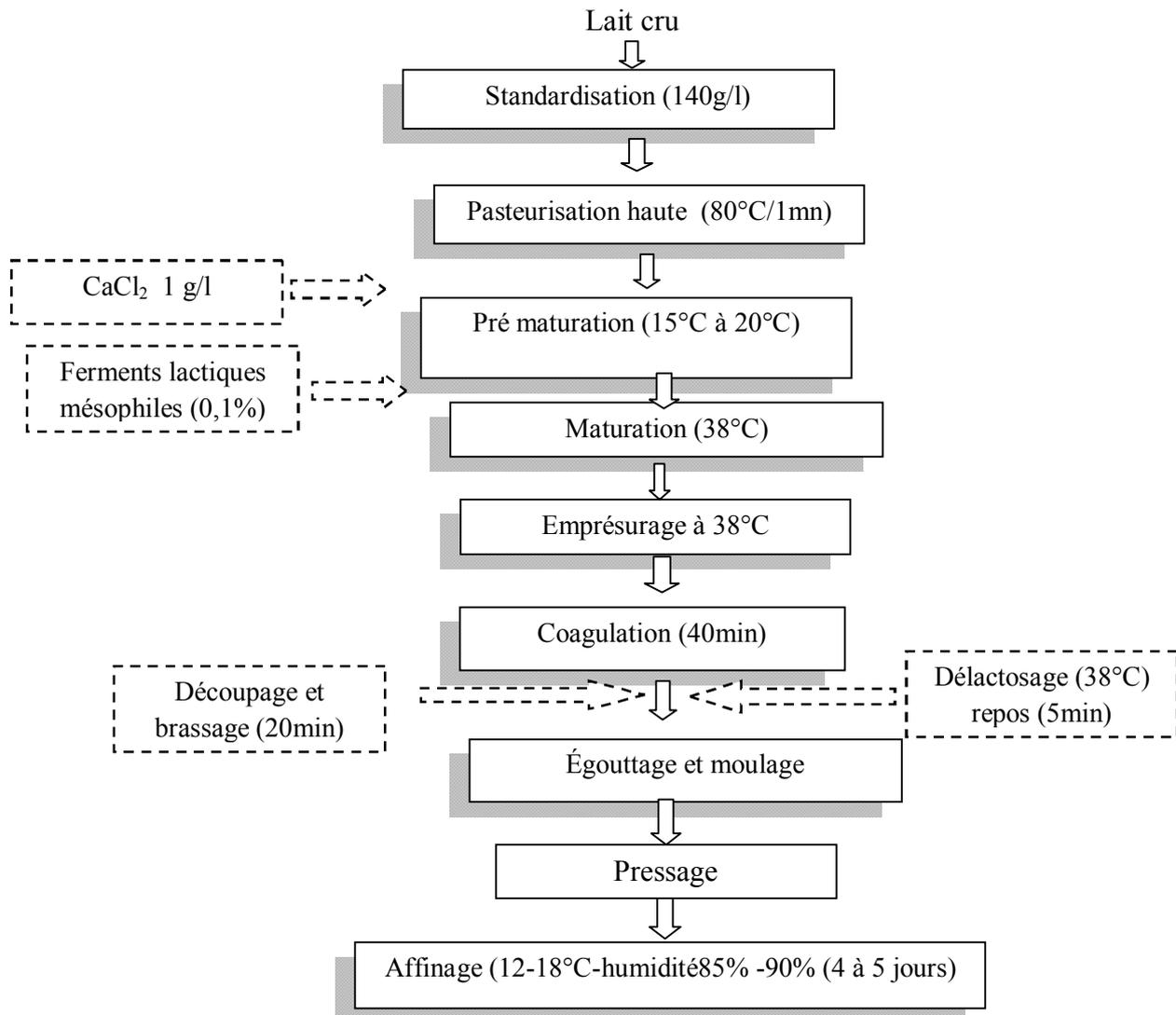


Figure n°35: Diagramme de fabrication de pâte à fromage à l'échelle de laboratoire.

➤ emprésurage

L'emprésurage par la présure commerciale, l'extrait de *Mucor* SF15 ainsi que les différents coupages entre les deux extraits est réalisé au laboratoire. IL est effectué à 38°C dans un bain marie, la coagulation complète dure au moins 40 mn. La concentration des extraits enzymatiques est préparée de façon à donner un temps de coagulation égal ou le plus proche l'un de l'autre, et cela en se basant sur la force coagulante de chaque préparation enzymatique.

➤ Découpage et brassage du caillé

Après la coagulation complète du lait, le caillé est découpé à l'aide d'un couteau et brassé à l'aide d'un fouet. Ensuite le caillé est laissé au repos pendant environ 20 mn ensuite un soutirage du lactosérum I en surface est effectué.

➤ **Dé lactosage**

Après soutirage du lactosérum I on ajoute le même volume d'eau (que le lactosérum soutiré) à 38°C. Un brassage doux est effectué, puis laisser au repos, ensuite soutirage du lactosérum II.

➤ **Pré pressage, moulage, pressage**

Contrairement à la fabrication de l'EDAM, le pressage du coagulum est réalisé à faible pression. Ces opérations qui donnent au caillé la forme de fromage et a pour but également d'éliminer le reste de lactosérum inter-granulaire. Il permet au lactosérum de s'échapper par auto pression exercée par le poids du caillé. Le moulage est réalisé dans des moules perforés de 250g et tapissé par une gaze.

➤ **Affinage**

Cette opération est réalisée dans un réfrigérateur réglé entre 12 et 18°C et une humidité de 85 - 90%, avec des retournements chaque jour. Cependant, on a trouvé des difficultés pour maintenir la température constante à cause de l'absence de l'hâloir. La durée d'affinage est de 3 à 4 jours pour ce type de fromage. La pâte de fromage est prête à être incorporer au cheddar dans des proportions bien définies pour la fabrication du fromage fondu.

4. Fabrication du fromage fondu à tartiner

4.1. Méthodes de la fabrication du fromage fondu à l'échelle de laboratoire

Travaillant avec des quantités à l'échelle de laboratoire, la fabrication de fromage fondu avec un procès industriel demeure impossible. Toutefois, nous avons essayé de reproduire le procédé de préparation du fromage à faible échelle sur des échantillons préparés avec une formulation identique. Ainsi, d'une part certaines étapes du procès sont supprimées et d'autres parts nous avons repris les paramètres de fabrication (Température, quantité d'eau, agitation et durée d'agitation) permettant d'avoir un fromage tartinable. La **Figure n°36** illustre les deux procédés de fabrication à savoir le procédé industriel et la préparation au laboratoire:

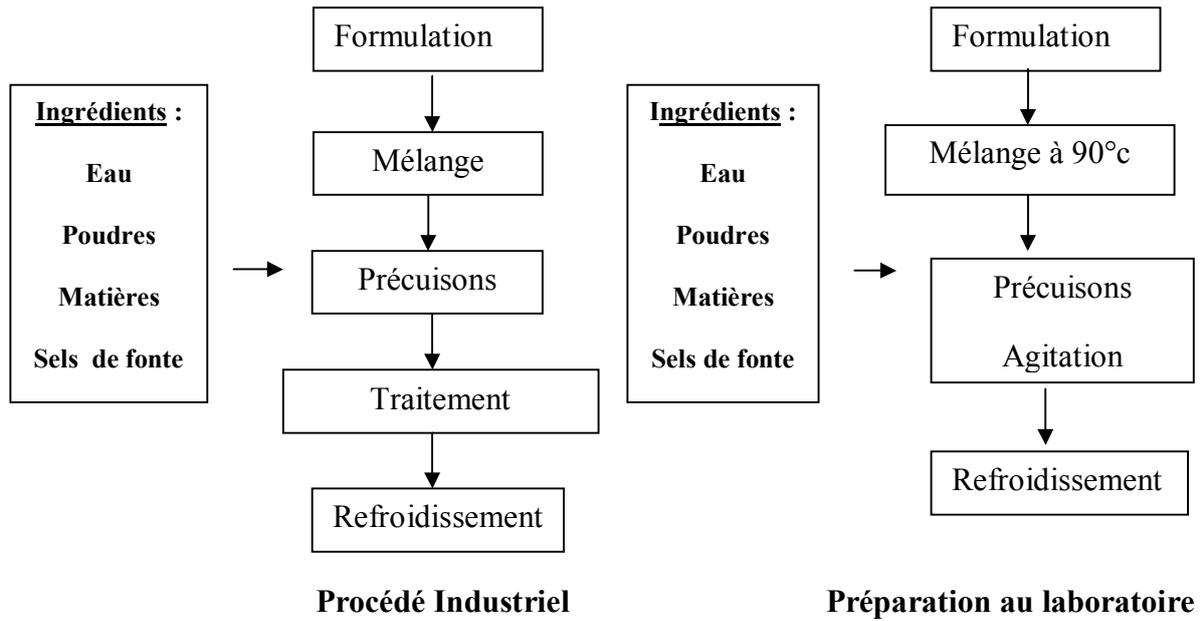


Figure n°36: Diagramme de fabrication de fromage fondu au niveau du laboratoire.

La formulation du mélange des différents ingrédients (exprimé en %) telle appliquée au niveau de la laiterie fromagerie de Boudouaou est représentée par le **Tableau n°18**.

Tableau n°18: Mélange d'ingrédients pour la préparation du fromage fondu pour tartine.

Ingrédients	(%) du mélange
Pâte à fromage	11.56
Fromage Cheddar	25.7
Pré fonte	1.02
Eau	45
Poudre de lait	15.5
Sels de fonte	1.11

L'objectif apparent de la nouvelle formulation demeure au niveau de la substitution du cheddar par la pâte à fromage préparée localement à hauteur de 31%.

4.2. Analyses physicochimiques du fromage

a) Les méthodes employées sont identiques à celles du lait, notamment la mesure du pH et de la matière grasse appliquée aux fromages (AFNOR, 1986).

b) Extrait sec

La détermination de l'extrait sec est réalisée à l'aide d'une étuve réglée à une température de $103 \pm 2^\circ\text{C}$. Le principe de la méthode repose sur l'élimination de l'eau jusqu'à obtention d'un poids constant de la prise d'essai analysée.

c) Rapport Gras /sec

La teneur en matière grasse dans la matière sèche correspond au pourcentage en masse de la matière grasse contenue dans l'extrait sec du fromage. Elle est exprimée en gramme pour 100g de matière sèche selon la formule suivante:

$$\text{MG/MS} \times 100$$

MG: teneur en matière grasse ;

MS: teneur en matière sèche.

V- Essai rhéologique des échantillons de fromage fabriqué à l'échelle de laboratoire.

Pour déterminer le comportement rhéologique des différents échantillons de fromage fondu pour tartine, nous avons utilisé un viscosimètre « Thermo HAAKE VT 550 » de l'unité de recherche en matériaux (FSI) (Figure n°37) avec une *géométrie cône plan* (Figure n°38).

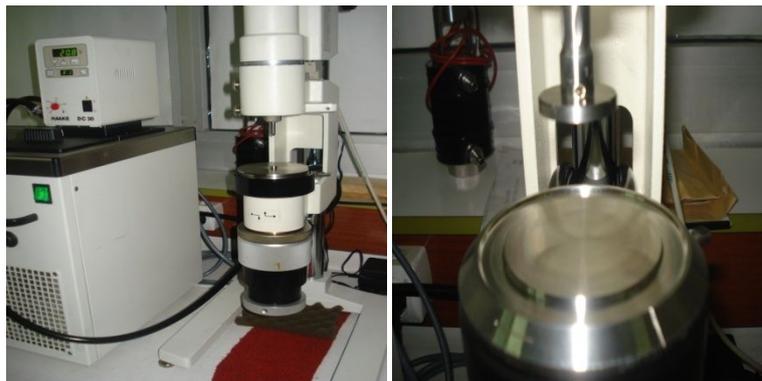


Figure n°37: Photo du viscosimètre « Thermo HAAKE VT550 » et du dispositif de mesure sur *géométrie cône plan*

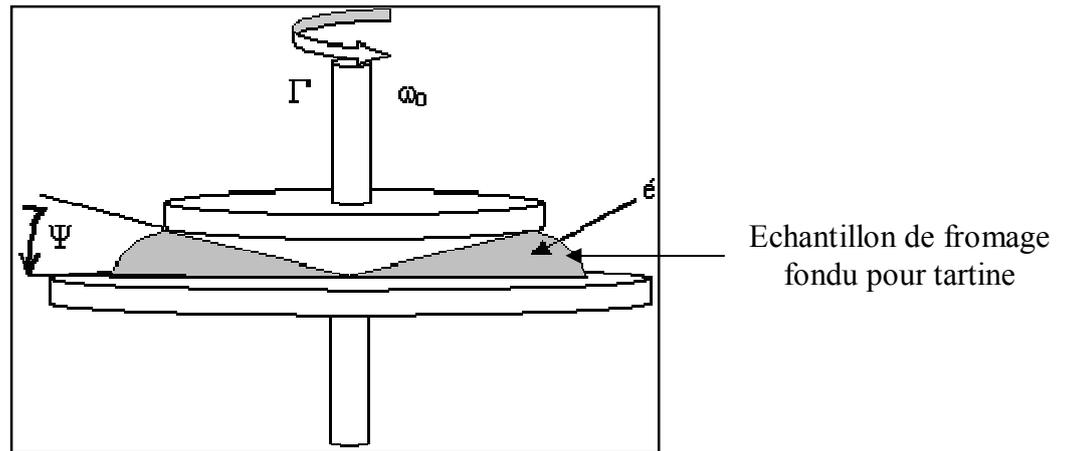


Figure n°38: Schéma de la géométrie cône plan du dispositif de mesure de la rhéologie (viscosité et contrainte) des échantillons de fromage fondu pour tartine.

C'est un viscosimètre qui contrôle et caractérise des échantillons visqueux en mode de rotation déterminant leur comportement rhéologique telle que la viscosité et la contrainte. La technique la plus utilisée avec ce type de viscosimètre, consiste à imposer une vitesse de cisaillement et calculer la contrainte de cisaillement et la viscosité apparente. L'angle de cône Ψ (**Figure n°38**) est très faible ($\leq 4^\circ$) pour obtenir un taux de cisaillement vertical constant dans le volume de mesure. Un logiciel permet la programmation et le contrôle des paramètres d'essai [valeur de l'entrefer, déformation, temps, fréquence, isotherme, paliers, rampe ou profil de température (association de rampes et de paliers), contrainte de cisaillement ou gradient de vitesse dans le fluide, etc.], la sauvegarde et le traitement des données. Un régulateur de température de type (HAAKE DC 30) est utilisé dans le but de maintenir la température à $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durant toute la durée de l'analyse.

➤ Essai de mesure

Un échantillon de fromage ne dépassant pas un volume de 0.1 cm^3 est déposé à l'aide d'une fine spatule, sur la surface plan du dispositif de mesure. La géométrie supérieure tourne (Cône) à une faible distance, l'échantillon en faible quantité remplissant le volume de mesure. Le résultat traité à l'aide d'un logiciel *Rheowin- logiciel facultatif* de HAAKE, est illustré par un graphe soit de la viscosité ou de la contrainte en fonction du temps.

Les constantes de mesure du dispositif en fonction des matériaux d'essai (Fromage fondu) sont les suivantes (en mode **PK1 – 1°**) (**Document HAAKE, Mode d'emploi**).

1. **Cône :**
 - Rayon R (mm) : **14**
 - Angle 10^{-2} (rad) : **1,74**
2. **Volume de remplissage (cm^3) : 0,1**
3. **Constantes :**
 - f (Pa/Ncm) : **1740,0** ; M (min/s) : **6**

Résultats et discussion

I- Identification de la souche *Mucor SF 15*

L'identification de la souche après séquençage par le produit de PCR est illustrée par la **figure n°39**.

```
TAATCAATAATTTTGGCTTGTCCATTATTATCTATTTACTGTGAACTGTATTATTACTTGACGCTTGAGG
GATGCTCCACTGCTATAAGGATAGGCGGTGGGGATGTTAACCGAGTCATAGTCAAGCTTAGGCTTGG
TATCCTATTATTATTACCAAAAAGAATTCAGAATTAATATTGTAACATAGACCTAAAAAATCTATAAA
ACAACTTTTAACACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAG
TGTGAATTGCATATTACAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTGCGCTCATTGGTATTCCAATGAG
CACGCCTGTTTCAGTATCAAAACAAACCCTCTAT[T/C]CAA[C/T]ATTTTTGTTGAATAGGAATACTGAG
AGTCTCTTGATCTTTTCTGATCTCGAACCTCTTCAAATGTACAAAGGCCTGATCTTGTGTTGAATGCCTGA
ACTTTTTTTTAATATAAAGAGAAGCTCTTGGCGGTAAACTGTGCTGGGGCCTCCCAATAATACTCTTTTT
AAATTTGATCTGAAATCAGGCGGGATTACCCGCTGAACTTAA
```

Figure n°39: Séquençage de la souche SF15.

La base de données nucléotidique a montré une homologie à 99% avec la souche de *Mucor circinelloides* sur un fragment de 587 pb. Par conséquent, notre souche a été désignée *Mucor circinelloides* SF15 avec le numéro d'accès (accession number) **MH368140** et les bases de données nous ont permis d'élaborer un dendrogramme phylogénétique pour SF15 et des souches apparentées (**Figure n°40**).

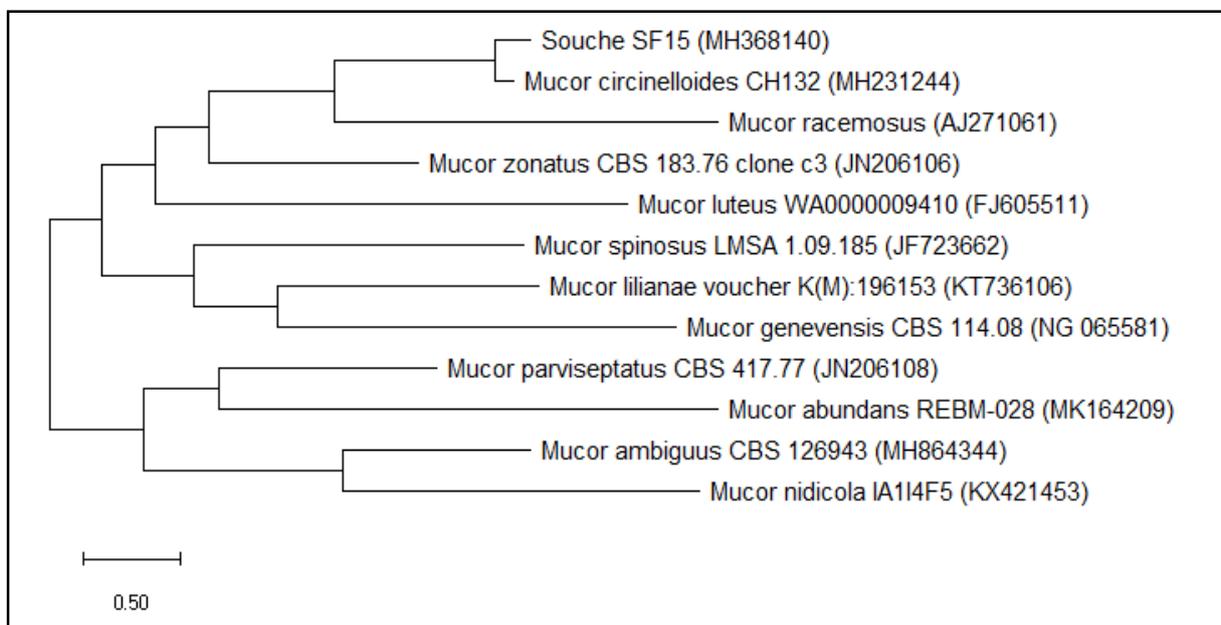


Figure n°40: Arbre phylogénétique dérivé de l'analyse de la séquence d'ADNr 18S de la souche SF15 et des séquences apparentées. Barre d'échelle 0,001 substitutions par position nucléotidique. Le numéro d'accèsion de GenBank pour chaque souche suit le nom de l'espèce.

II- Résultats de la fermentation de *Mucor* SF15

La croissance de la souche de *Mucor* SF15 a été obtenue sur un milieu de fermentation à base de son de blé additionné à des facteurs de croissance, suivi d'une incubation de 05 jours à température de 35°C.

En effet, l'utilisation d'un sous produit de meunerie tel que le son de blé répond bien à une exigence nutritionnelle des cellules microbiennes avec une richesse en constituants du blé tels que les minéraux et les vitamines particulièrement les vitamines hydrosolubles (**Merheb et al., 2007**). Selon plusieurs auteurs, le son de blé, produit valorisable, est une source appréciable d'énergie et de matières azotées. Ainsi, **Agrawal et al. (2005)** a mesuré l'activité protéasique produite par *A. oryzae* NCIM 649 sur le son de blé supplémenté par 0,1% des protéines de soja, **Lazim et al. (2009)** pour la production d'une protéase alcaline par *Streptomyces sp.* CN902 cultivée sur un mélange du son de blé et des pierres de dattes hachées et **Chellappan et al. (2006)** lors de la production d'une protéase alcaline par *Engyodontium album* BTMFS10 sur un milieu à base du son de blé. Par ailleurs, **Fazouane et al. (2010)** ont utilisé le son de blé comme source énergétique et du sulfate d'ammonium comme source azotée dans la croissance des spores d'*Aspergillus niger* pour la production d'une protéase coagulant le lait. **Talantikite et al. (2012)** ont également utilisé du son de blé dans la fermentation et la croissance de *Bacillus mojavensis* I33M.

Dans nos essais, l'emploi du son de blé broyé à raison de 30g mélangés à 60ml d'une solution à 0.01% de sulfate d'ammonium et 1g de poudre du lait de type *Low heat*, a permis d'extraire un taux de protéine de 16 mg/ml dans l'extrait protéique brute.

Par ailleurs, lors de la production de la biomasse de *Mucor* SF15, un procédé de fermentation semi solide a été utilisé. Par comparaison, un essai par fermentation liquide a donné des résultats mitigés. Auparavant, selon **Simon et Meunier (1970)**, les protéases issues d'*Aspergillus* et de *Mucor pusillus* sont produites sur des milieux semi-solides. Ainsi, les premiers travaux de Somkuti et Baloil (**Aunstrup et al., 1979**) ont montré que les souches ATCC 1648 et NNRL 2543 de *Mucor pusillus* pouvaient produire une protéase coagulant le lait en culture liquide dans un milieu en suspension contenant 5% de son de blé. Les quantités produites sont cependant très faibles par rapport à celles issues de la culture en milieu semi solide, ce qui confère à ce procédé un intérêt industriel beaucoup plus grand.

De plus, des enquêtes sur la production de protéase par des cultures fongiques ont montré qu'il existe une variation de la quantité d'enzyme produite selon le milieu utilisé (**Andrade et al., 2002**).

1. Obtention de l'enzyme coagulante

Nous rappelons que les protéases à pouvoir coagulant et protéolytique sont produites principalement par des moisissures dont les plus connues sont le genre *Mucor* avec les espèces *miehei* et *pusillus* et le genre *Endothia* de l'espèce *parasitica*.

Cependant, des exceptions sont faites pour quelques espèces bactériennes telles que, *Bacillus subtilis* (Ghafour, 2010 ; Do Thi Bich Thuy, 2011) et *Bacillus mojavensis* (Talantikite *et al.*, 2012).

Afin d'enrichir la base de données des souches fongiques à pouvoir coagulant, la souche employée est une moisissure de genre *Mucor* isolée localement à partir du sol de la laiterie fromagerie de Boudouaou et identifiée par séquençage de son rADN 18S et codée SF15.

a. Caractère apparent de l'extrait enzymatique brut

La culture de *Mucor* SF 15 sur le milieu de son de blé additionné de poudre de lait a donné, après une incubation de 05 jours à 35°C un extrait protéique de couleur noir assez prononcé et une odeur assez caractéristique dont nous avons soupçonné une contamination par des levures.

Tableau n°19: Caractères apparents des extraits enzymatiques issus de la fermentation de *Mucor* SF15.

Extrait enzymatique brut de <i>Mucor</i> SF15	Caractères apparents		
	Viscosité	Odeur	Couleur
	Non visqueux	prononcée	Brun foncé

La filtration de la biomasse obtenue après l'incubation a donné au début de l'expérimentation un extrait enzymatique brut de couleur marron jaunâtre. Cependant, cette coloration a évolué vers une couleur prononcée brunâtre probablement due à une oxydation des constituants du milieu de fermentation sous l'effet de l'oxygène moléculaire (**Figure n°41**).



Figure n°41 : Extrait enzymatique brut de *Mucor circinelloides* SF15.

Cependant, nous avons essayé à chaque étape de notre travail d'éliminer la coloration brune due au phénomène de brunissement enzymatique, et de procéder à une désodorisation des échantillons. Ainsi, diverses méthodes telles que, la filtration de l'extrait, la centrifugation à froid ou encore le passage de notre extraits sur des graines de charbon actif ont été employées mais sans grand résultat. En effet, l'EEB obtenu a été clarifié par un passage à travers le gel sephadex G-50 sur une colonne semi préparative.

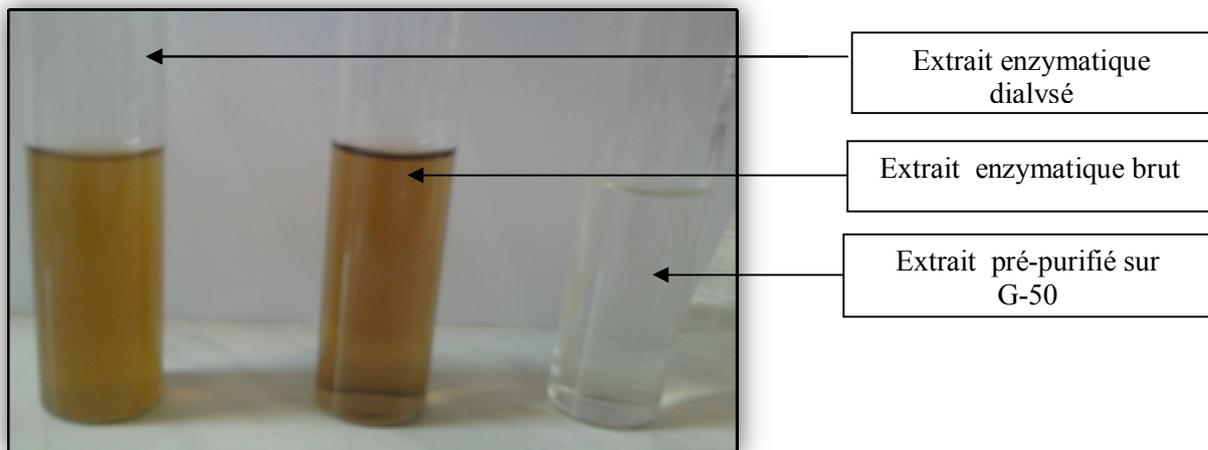


Figure n°42: Aspect comparé des extraits enzymatiques de *Mucor circinelloides* SF15.

III- Résultats des purifications partielles

1. Purification partielle au sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium provoque une déshydratation et précipitation des protéines contenues dans la solution protéique, tout en conservant leur conformation native et une dissociation sans dénaturation.

La précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium des extraits enzymatiques bruts par passage des échantillons d'une saturation de 40 à 80% a permis d'une part de concentrer les

extraits et de réduire le taux de protéines contaminantes et d'améliorer l'activité coagulante de l'extrait brut. En effet, le surnageant est mis en suspension dans l'eau distillé pour dialyse à l'aide d'une membrane semi perméable (boudin de dialyse). La dialyse menée à froid pendant 48 h a permis de réduire le temps de coagulation de l'activité coagulante de presque deux fois. Il est passé de **3,53 mn** dans l'extrait brut à **2,24 mn** dans l'extrait dialysé.

2. Emploi du gel filtration semi préparative dans la décoloration des extraits de *Mucor circinelloides* SF15.

Le passage des extraits bruts de *Mucor* SF15 à travers une colonne de gel sephadex G-50 a permis une décoloration totale associée à une prépurification au sulfate d'ammonium de ces derniers destinés à la fabrication fromagère.

3. Activités coagulantes des extraits enzymatiques

La mesure de l'activité coagulante exprimée en Unité soxhlet (US) des extraits de *Mucor circinelloides* SF15 a été effectuée dans le but de réaliser des coupages avec la présure commerciale et permettre ainsi la fabrication de la pâte à fromage par un procédé de coagulation du lait.

Le **tableau n°20** résume les valeurs des activités coagulantes et du temps de prise de l'extrait brut et de la présure.

Tableau n°20: Résultat de l'activité coagulante de l'extrait dialysé, prépurifié et de la présure commerciale.

Paramètres Extrait	Le temps de coagulation (sec)	Activité coagulante (US)
Extrait dialysé	144	167
Extrait pré-purifié	334	81
Présure commerciale	233	103

Les résultats observés montrent des activités proches l'une de l'autre. D'une part, l'intérêt des temps de coagulation trouvés se rapprochant des valeurs de 4-5 mn, temps idéal de coagulation pour les préparations enzymatiques (Tsouli, 1974). D'autre part, la présure commerciale sous forme de poudre titrant une activité de 1800U/g a été diluée de façon à observer un temps de prise proche de 4 mn.

Par ailleurs, la comparaison des activités de l'extrait enzymatique de *Mucor* avec la présure commerciale est relative.

En effet, Cette valeur est largement plus faible comparée à la présure utilisée dans l'industrie fromagère, qui titre une force de 1/10.000. Nos résultats ont montré que l'extrait pré-purifié de *Mucor SF15* possède une activité coagulante supérieure à celles rapportées par **Ozturkoglu-Budak et al. (2016)** pour les souches de *Penicillium brevicompactum* (14,19 U/mg), *Penicillium corylophilum* (13,44U/ mg) et *Penicillium chrysogenum* (11,85 U / mg). Cependant, l'activité de la protéase extracellulaire de *Geotrichum candidum* est faible comparée à son activité intracellulaire (**Desmaures, 2014**).

4. Concentration en protéines totales

La concentration en protéines totales de l'extrait de *Mucor SF 15* est de l'ordre de 16 mg/ml. Ce taux obtenu ne reflète pas avec précision la concentration en protéines recherchées (protéases), mais comporte en plus des protéines coagulantes d'autres types de protéines de nature diverse. En effet, cette valeur est supérieure à la valeur obtenue par **Souza et al. (2017)** pour la protéase issue d'*Aspergillus foetidus* (4,327 g mL⁻¹).

La texture du coagulum observée dans les échantillons obtenus avec la présure commerciale est plus ferme comparée à celle obtenue avec l'extrait de *Mucor SF15*. En effet, ce dernier manifeste une certaine synérèse démontrant une activité protéolytique plus prononcée (**Figure n°43**).

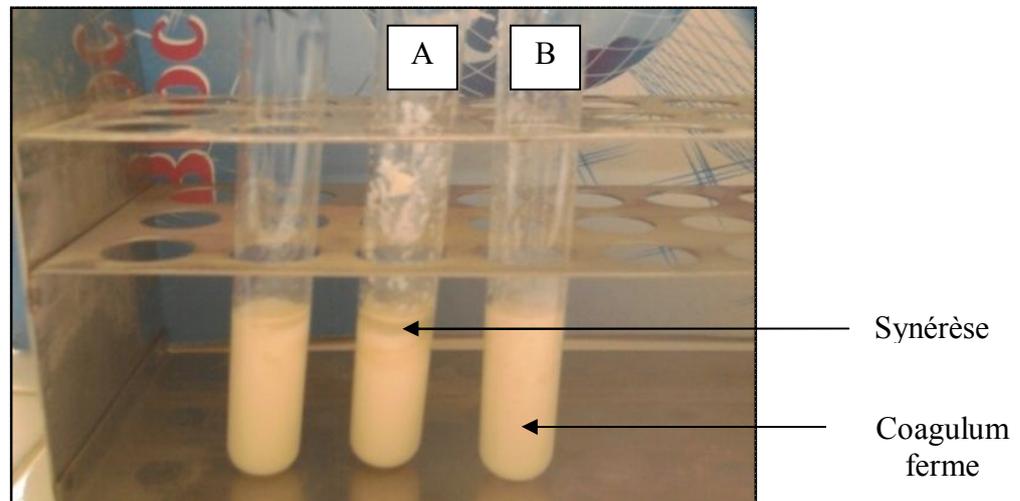


Figure n°43: Coagulum obtenu avec l'extrait de *Mucor SF15* (A) et de la présure commerciale (B).

5. Détermination de l'indice AC/AP de l'extrait de *Mucor SF15*

La détermination du rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique (AC/AP) permet d'apprécier l'aptitude d'une préparation enzymatique à coaguler le lait. Toutefois, la mesure de l'indice permet de confirmer le pouvoir coagulant des succédanés de la présure.

En comparant l'indice observé chez les extraits de *Mucor SF15* par rapport à celui donné par la littérature (**Mazorra- Manzano, 2013**), il semblerait que la valeur trouvée est appréciable et confirme les aptitudes de cette souche à être employée dans l'industrie fromagère.

Majumder et al. (2015) indiquent que les valeurs du rapport AC / AP de la protéase de *Termitomyces Clypeatus* et celle obtenue à partir d'une préparation commerciale était considérablement similaire et pourrait être considérée comme un remplaçant à la chymosine.

Les activités coagulantes, protéolytiques et l'indice AC/AP sur caséine observées chez certaines présures sont consignés dans le tableau suivant (**Tableau n°21**).

Tableau n°21: Indices AC/AP de quelques enzymes comparés à celui de *Mucor SF15*.

Coagulant	AC (U.mg ⁻¹)	AP (U.mg ⁻¹)	Indice AC/AP	Références
<i>Mucor SF15</i>	81	0.29	280	Notre échantillon
Chymosine	182.3	0.35	520	Mazorra-Manzano et al. (2013)
<i>Mucor mucedo</i>	356 ± 10	5.4 ± 0.8	65.9	Yegin et al. (2012)
<i>Termitomyces Clypeatus</i>	240 ± 2.70	9.08 ± 0.11	26.56	Majumder et al.(2015)
<i>Rhizomucor miehei</i> (préparation commerciale)	271 ± 1.5	3.9 ± 0.4	69.48	Majumder et al.(2015)

Le **tableau n°21** montre que les résultats sont considérés comme très satisfaisants pour l'extrait enzymatique prépurifié de *Mucor SF15* et possédant le potentiel de remplacer la présure traditionnelle dans l'industrie fromagère.

IV- Résultats de coupages enzyme commerciale/extrait coagulant de *Mucor circinelloides SF15*

Les résultats des activités coagulantes des préparations coupées enzyme commerciale/extrait de *Mucor SF 15* sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau n°22: Activité coagulante et force de coagulation exprimée en pourcentage de coupage.

Coupage	Temps de coagulation (min)	La force de coagulation (US)
50/50	4.44	84
60/40	4.36	87
80/20	4.23	91

D'après les résultats trouvés, la valeur du temps de coagulation observé chez les différentes préparations enzymatique sont très proches de la valeur préconisée à l'échelle industrielle soit 4 à 5 mn (Tsouli, 1974).

Afin d'apprécier la validité de la méthode de Berridge dans la mesure de la force, nous avons comparé les valeurs théoriques et expérimentales (Tableau n°23).

Tableau n°23: Activités coagulantes comparées des coupages des extraits de présure commerciale et de *Mucor* SF 15 (valeur théorique et expérimentale).

Présure	Extrait enzymatique pré-purifié	Force théorique	Force expérimentale
100%	0%	-	138.7
50%	50%	114.1	114.2
60%	40%	119	121.8
80%	20%	128.8	125.6
0%	100%	-	89.5

En effet, l'appréciation même visuelle de temps de prise a donné des résultats presque identiques aux valeurs théoriques.

V- Résultats de la fabrication de la pâte à fromage

1. Analyses physicochimiques du lait

Tableau n°24: Résultats des analyses physicochimiques du lait cru avant pasteurisation.

Analyses	Lait avant pasteurisation	Normes (AFNOR ,1986)
pH	6,4-6,5	6,55 – 6 ,65
Acidité (°D)	17-18	16 - 17
Densité	1030-1032	1028 - 1030
MG (g/l)	35-38	30 - 44

Les résultats observés avant pasteurisation du lait frais destiné à la fabrication de la pâte à fromage, sont conformes aux normes AFNOR (1986).

2. Pâte à fromage

Les résultats des analyses physico chimiques de la pâte à fromage fabriquée à partir de 1,5 L de lait de vache pasteurisé sont consignés dans le tableau ci-dessus :

L'analyse de la variance (ANOVA à un facteur) est utilisée pour montrer s'il existe des différences au niveau des paramètres de la pâte à fromage, en fonction du coupage. Les résultats sont donnés par le **tableau n°25**.

Tableau n°25: Résultats des analyses physicochimiques de la pâte à fromage.

Coupage Paramètre	100% présure	100% EP	50% P/ 50% EP	60% P/ 40% EP	80% P/ 20% EP	p
pH	4,87±0.02	4,78±0,025	4,48±0,04	4,93±0,04	4,91±0,06	0,00000
MG (g/l)	25±1,80	19±1	21±1,73	22±1,80	23±2,18	0,01876
E.S.T	47±2.97	46,36±1.95	42,66±1,89	44,05±1.32	45,43±2,66	0.09040
G/S (%)	53.19±3,1	40.98±2,60	49.22±4,01	49.94±3,41	50.62±1,70	0.00041

En rouge, les paramètres correspondant aux valeurs de probabilité significative $p < 0,05$; probabilité hautement significative $p < 0,01$; p : probabilité ; P : présure ; EP : enzyme pré-purifié.

La comparaison entre coupages présentée par le **tableau n°25** montre que le coupage a une influence très hautement significative ($p < 0,01$) sur le pH, le rapport MG/Sec et le rendement en faveur de coupage présure 100%.

Le coupage a également une influence significative ($p < 0,05$) sur la MG. Par contre, ce dernier n'a aucun effet significatif sur l'EST ($p > 0,05$).

3. Rendement fromager

Le rendement fromager est une des données les plus importantes pour une fromagerie. En effet la quantité de fromage généralement obtenue est faible par rapport à la quantité d'ingrédients mis en œuvre (il faut environ 100 kg de lait pour obtenir 10 à 12 kg de fromage) autrement dit, une faible variation de rendement peut avoir des conséquences économiques importantes (**Vignola, 2010**).

La **figure n°44** donne les rendements fromagers des différents échantillons de pâte à fromage fabriqués au cours de l'expérimentation. Le rendement fromager présente un grand intérêt en industrie fromagère car il reflète globalement comment a été réalisé la répartition quantitative des constituants du lait lors de l'égouttage.

Selon la **figure n°44** on constate une différence du rendement fromager entre les différents échantillons de pâte à fromage. Ces rendements semblent plus importants pour les échantillons préparés avec la présure à 100%.

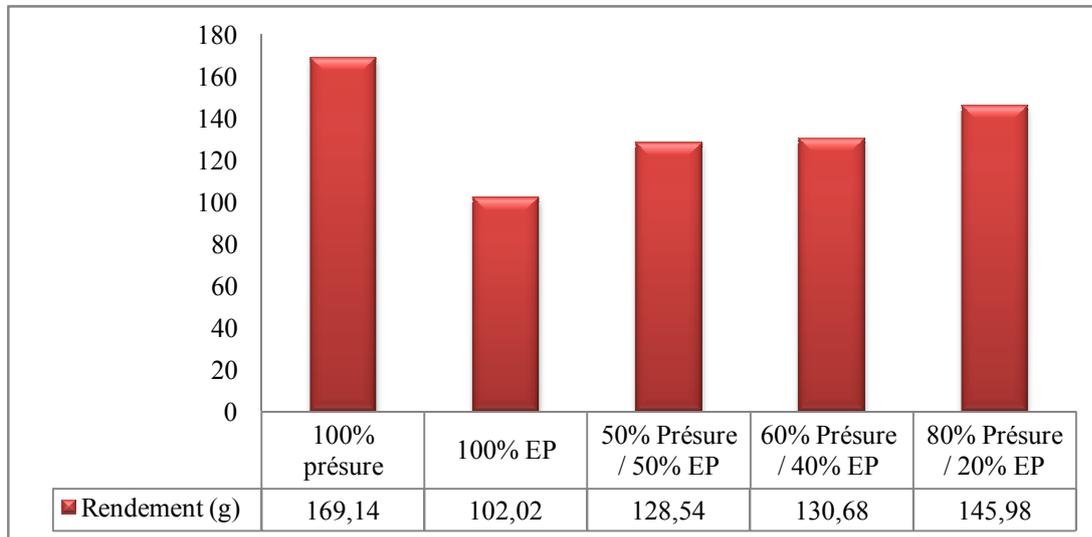


Figure n°44: Rendements fromagers des différents échantillons de la pâte à fromage.

Selon **Fenelon et Guinee (1999)**, les facteurs influant sur le rendement fromager incluent le type coagulant, la composition du lait, la quantité et les variantes génétiques de la caséine, la qualité du lait, comptage des cellules somatiques (CCS) dans le lait, la pasteurisation du lait, la fermeté du caillé à la coupe et les paramètres de la fabrication.

4. Effet du coupage sur le rendement fromager

Tableau n°26: Résultats de l'analyse de la variance (ANOVA à un facteur) du rendement fromager en fonction du coupage.

	100% P	100% EP	50% P/ 50% EP	60%P/ 40% EP	80%P/ 20% EP	P
Rendement fromager	169,14±13	102,02±3,13	128,54±4,37	130,68±6,57	145,98±10,33	0,000000

p : probabilité ; P : présure ; EP : enzyme pré-purifié.

Le **tableau n°26** montre qu'il existe une différence hautement significative entre les différents coupages en ce qui concerne le rendement fromager ($p < 0,01$).

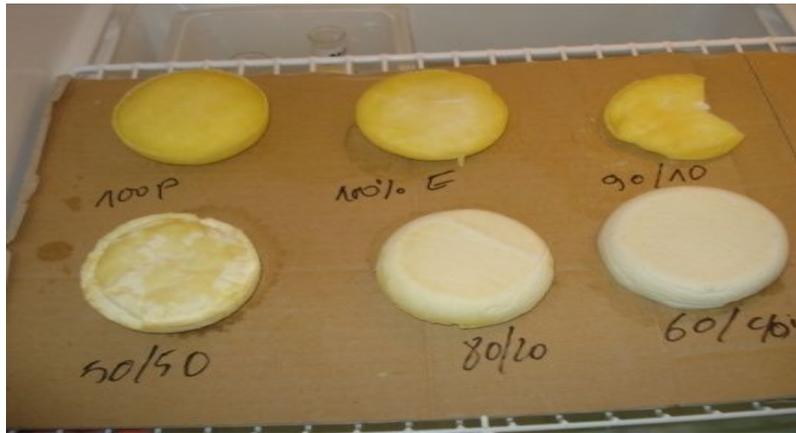


Figure n°45: Photo de pâte à fromage pour les différents coupages.

5. Résultats de la fabrication du fromage fondu

Tableau n°27: Résultats des analyses physicochimiques du fromage fondu à tartiner.

Analyses	100% présure	100% EP	50%P 50% EP	60% P 40% EP	80%P 20% EP	P
pH	5.58±0.01	5.55±0.05	5.43±0.02	5.50±0.02	5.53±0.06	0.991
MG (g/l)	18±1.17	18±1.45	19±2.1	19±1.66	19±1.36	0.826
E.S.T(g/l)	47.66±3.22	45.58±4.75	49.53±3.15	48.35±2.25	48.57±3.66	0.025
G/S (%)	37.76±2.4	39.4±1.25	38.36±2.22	39.29±1.37	39.11±1.80	0.222

En rouge, les paramètres correspondant aux valeurs de probabilité significative $p < 0,05$; p : probabilité ; P : présure ; EP : enzyme pré-purifié

Dans l'analyse de la composition des fromages fondus à tartiner en fonction du coupage, aucun effet significatif n'est observé sur le pH, la MG et le G/S. En effet, un effet significatif est observé sur l'EST.

➤ pH

Les valeurs de pH des différents échantillons se situent dans l'intervalle donné par **Eck et Gillis (1997)** (5,3 à 5,8).

En effet, le pH du fromage fondus varie entre 5,4 et 5,8 selon **Roustel (2014)** et 5,50 à 5,55 d'après **Roustel et Boutonnier (2015)**.

Le pH final a des effets significatifs sur la qualité, la microstructure et le type d'interactions entre les protéines dans le fromage fondu (**Marchesseau et al., 1995**).

➤ Extrait sec total

Pour les fromages fondus tartinable la teneur en matière sèche est de 25, 30 et 40% avec un rapport du G/S allant de $G/S < 30\%$, $G/S \geq 30\%$ et $G/S > 50\%$ respectivement (**Codex alimentaire, 2015**).

Alors qu'en 2016, **Richonnet** préconise un taux de 50% de matière sèche dans les fromages fondus.

➤ **Matière grasse**

Les différents échantillons de fromage montrent une teneur en MG plus ou moins faible par rapport aux normes données par les auteurs.

Par ailleurs, selon **Richonnet (2016)**, la teneur des fromages fondus en lipides est de l'ordre de 21 à 22 g/100g de fromage alors que **Oliveira et al. (2016)** rapportent une teneur en lipides $\geq 30\%$.

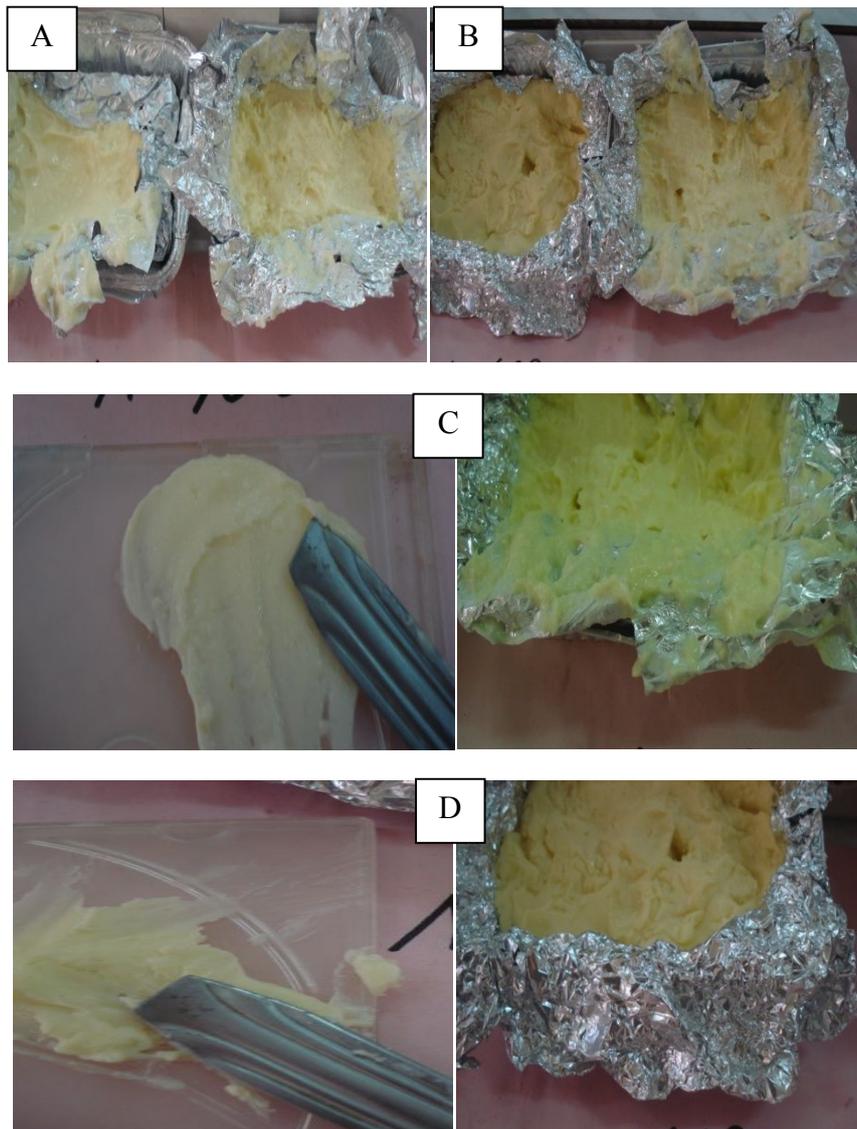


Figure n°46: photos représentent le fromage fondu à tartiner de différents coupages (A : 50%P/50%EP ; B : 60%P/40%EP ; C : 100% EP ; D : 100% P).

VI- Etude des propriétés rhéologiques du fromage fondu pour tartine fabriqué à l'échelle de laboratoire

Pour étudier l'effet des conditions de fabrication du fromage fondu à savoir le taux de pâte à fromage incorporé avec le cheddar et les préparations enzymatiques (coupage présure commerciale/ extrait enzymatique de *Mucor* SF15) sur le comportement rhéologique des échantillons, nous avons représenté l'évolution de la viscosité apparente et de la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement exprimé en Seconde^{-1} (S^{-1}).

1. Viscosité apparente

Le graphe de la **figure n°47** représente l'évolution de la viscosité du fromage en fonction de la vitesse de cisaillement en géométrie cône plan. Cette évolution négative, c'est à dire la viscosité diminue en augmentant la vitesse d'écrasement rotationnel du produit entre les 2 surfaces du cône plan. L'allure des courbes est identique pour l'ensemble des échantillons et la diminution de la viscosité des échantillons est caractéristique d'un comportement rhéofluidifiant.

La rhéologie des échantillons confirme leur texture fondue tartinable. D'après la courbe, l'échantillon issu du coupage 60/40 est le plus visqueux autrement dit c'est le fromage le plus mou facile à tartiner (**Figure n°47**).

En revanche, le fromage présure possède la viscosité la plus élevée, cela est due vraisemblablement à la texture ferme de la pâte à fromage. Il est suivi par l'échantillon 80/20 (80% présure et 20% extrait de *Mucor* SF15).

La texture molle des fromages est due non seulement au procédé technologique mais aussi à la texture lâche de la pâte de fromage incorporée au cheddar et fabriquée à base d'un succédané de la présure.

En effet, d'après **Hurtaud et al. (2009)**, les caractéristiques rhéologiques des fromages sont influencées par les paramètres technologiques mis en œuvre (traitement thermique du lait, standardisation de la matière grasse, doses et natures des levains ou durée d'affinage).

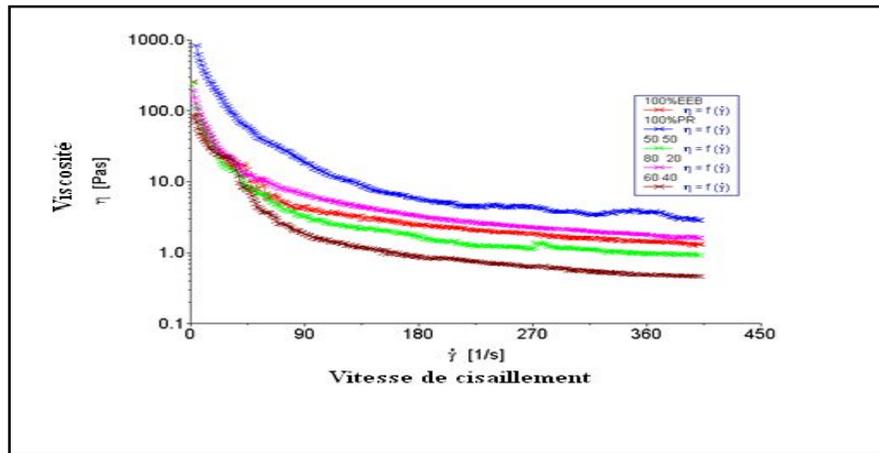


Figure n°47: Viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement d'un échantillon de fromage fondu pour tartine.

2. Contrainte

La contrainte de cisaillement des échantillons de fromage sont exprimés par les courbes de la **figure n°48**. Dans ce type de fluide, la contrainte de cisaillement augmente avec la vitesse. L'échantillon à 100% présure demeure toujours une exception avec une valeur plus élevée comparé aux échantillons coupés.

Toutefois, l'examen rhéologique de nos échantillons paraît mal résolu et les courbes obtenues ne manifestent pas réellement un comportement rhéofluidifiant.

En effet, la texture molle des fromages obtenus n'est pas homogène suite à la présence de fins grumeaux dans le mélange de fabrication du fromage.

Cette texture grumeleuse est due au fait que la préparation du fromage a été réalisée à l'échelle de laboratoire avec toutes les contraintes observées lors de la fabrication.

Le plan rhéologique, les courbes présentent des artéfacts et des coupures qui lors du cisaillement, les fins grumeaux freinent d'une part la vitesse et d'autre part des espaces vides sont créés dans la pâte ce qui se manifeste par des coupures au niveau des courbes. La zone entre 0 et 90 S^{-1} est caractéristique de ce phénomène.

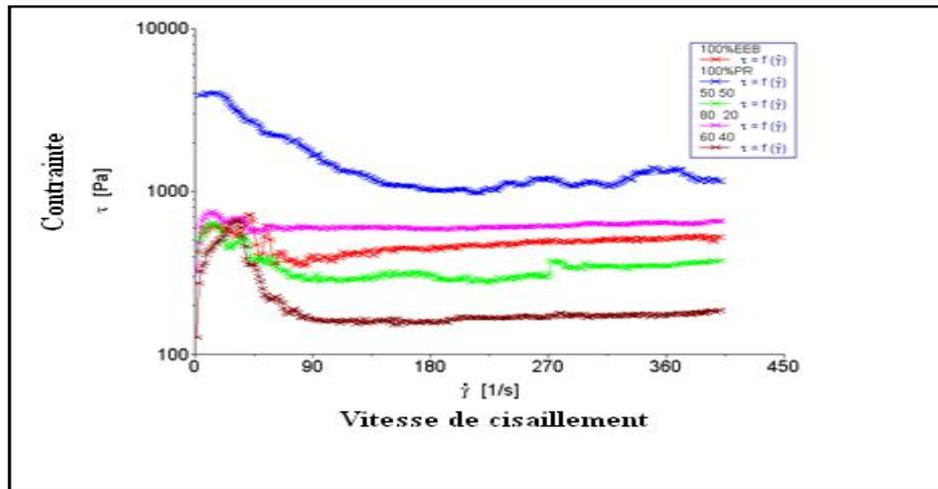


Figure n°48: Contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement d'un échantillon de fromage fondu pour tartine.

Conclusion

L'objectif de notre travail est de donner une appréciation sur la qualité d'un fromage fondu fabriqué à partir d'une formulation de la *laiterie fromagerie de Boudouaou* en utilisant un succédané de présure issu d'une souche d'origine fongique (*Mucor SF15*). Trois volets principaux ont été examinés, intégrer une présure de remplacement dans la coagulation du lait destiné à la fabrication de la pâte à fromage, fabrication de la pâte à fromage avec des préparations enzymatiques obtenues par coupage de la présure commerciale et de l'extrait de *Mucor SF15*, incorporer la pâte à fromage en remplacement partiel du cheddar dans la fabrication du fromage fondu à tartiner.

Dans la première partie des résultats, nous avons obtenu un extrait enzymatique à partir d'une culture en surface de *Mucor SF15* sur un milieu de fermentation à base de son de blé additionné à des facteurs de croissance. La biomasse obtenue a donné un extrait enzymatique brut de couleur marron jaunâtre dont la coloration a évolué vers une couleur brunâtre prononcée probablement due à une oxydation. Cependant, le passage des extraits bruts de *Mucor SF15* à travers une colonne semi-préparative sur gel sephadex G-50 a permis une décoloration totale associée à une purification partielle de ces derniers destinés à la fabrication fromagère.

Dans le second volet, les résultats ont montré que l'extrait brut possède une activité coagulante de $81 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ et un indice AC/AP de 280 confirmant ainsi les aptitudes des extraits de *Mucor SF15* à coaguler le lait. Par ailleurs, le coupage de l'extrait pré-purifié avec la présure commerciale a permis également de donner des coagulums appréciables à base de

lait de vache pasteurisé et une pâte à fromage ferme après 4 jours d'affinage. L'incorporation des différents échantillons de la pâte à fromage obtenue avec des coupages d'enzymes aux pourcentages de 0, 50/50, 80/20 et 60/40 ont permis de fabriquer des fromages fondus tartinables à l'échelle de laboratoire avec plus ou moins de succès sur le plan rhéologique. La rhéologie des fromages confirme leur texture fondue tartinable. En effet, l'échantillon issu du coupage 60/40 est considéré le plus visqueux autrement dit c'est le fromage le plus mou et facile à tartiner. Toutefois, l'analyse des courbes de contrainte de cisaillement obtenues montre que le fromage fabriqué à l'échelle de laboratoire ne manifeste pas réellement un comportement rhéofluidifiant contrairement à la mesure de la viscosité.

Références bibliographiques

- Abdelfattah A.F., El-hawwary, N.M., 1974.** Studies on the production of milk clotting enzymes, proteolytic enzymes and mucilage by fungi. *Journal of Gen. Microbiology*, 84, p.p.327–331.
- AFNOR, 1986.** Association Française de Normalisation, Contrôle de produits laitiers. Recueil des normes Française. 3^{ème} édition.
- Agrawal D., Patidar P., Banerjee T., Patil S., 2005.** Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemical*, 40; p.p.1131-1136.
- Alves L. S., Merheb-Dini C., Gomes E., da Silva R., & Gigante M. L., 2013.** Yield, changes in proteolysis, and sensory quality of Prato cheese produced with different coagulants. *Journal of Dairy Science*, 96(12), p.p.7490–7499.
- Andrade V. S., Sarubbo L. A., Fukushima K., Miyaji M., Nishimura K., & Takaki G. M. C., 2002.** Production of extracellular protease by *Mucor Circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, (33), p.p.106–110.
- Aunstrup K., O. Andersen Falch E.A., Nielsen T.K., 1979.** Economics of fermentation process. In: *Microbial Technology. Fermentation Technology*, Vol. 2. Pepler H.J and D. Perlman (eds) Academic Press New York, NY, États-Unis.
- Chellappan S., Jasmin C., Basheer S.M., Elyas K.K., Bhat s.G., M. Chandrasekaran M., 2006.** Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemical*, 41; p.p.956–961.
- Codex Alimentaire, 2015.** Projet de norme générale pour le fromage fondu (étape 6), CL 2015/34-MMP décembre 2015.
- Davet P., Rouxel F., 1997.** Technique for direct isolation of microorganismes from soil. Collection Technique et pratique. INRA Editions (Rennes, France).
- Desmaures N., 2014.** Cheese: Mold-Ripened Varieties. In: Tortorello, M.L. (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford, p.p. 409- 415.

- Do Thi Bich Thuy., 2011.** Characterization of Multiple Extracellular Proteases Produced by a *Bacillus subtilis* Strain and Identification of the Strain. *International Journal of Biology*, 3 (1), p.p.107-112.
- Eck A., Gillis J.C., 1997.** Les Enzymes D'origine Animale : Le Fromage De La Science A L'assurance Qualité, 3ème Edition, Lavoisier Tec& Doc. Paris.
- Fazouane-Naimi F., Mechakra A., Abdellaoui R., Nouani A., Magagi daga S., Aizouma A.M., Gais S., Penninckx M.J., 2010.** Characterization and cheese-making properties of Rennet-like enzyme produced by a local Algerian isolate of *Aspergillus niger*.
- Fenelon M.A., Guinee T.P., 1999.** The effect of milk fat on Cheddarcheese yield and its prediction, using modifications of the Van Slyke cheese yield formula. *Journal of Dairy Science*, 82, p.p. 2287-2299.
- Ghaffour A., Hasnain S. 2010.** Purification and characterization of an extracellular protease from *Bacillus subtilis* EAG- 2 strain isolated from ornamental plant nursery. *Polish Journal of Microbiology*. 59(2), p.p.107-112.
- Hurtaud C., Peyraud J.L., Michel G., Berthelot D., Delaby L., 2009.** *Animal*, 3, 1327-1338.
- Kahlouche A., Nouani A., 2017.** Characterization of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus mojavensis* P47M strain isolated from Algerian dairy farm soil. *Research Journal of Biotechnology* , 12 (12), p.p.37-45.
- Kamoun P., 1977.** Appareils et méthodes in biochimie. 3^{ème} ed flammarian ; Paris.
- Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I., Limam F., 2009.** Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *Indian Journal of Microbiology and Biotechnology*. 36, p.p.531-537.
- Lowry O.M., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R. J., 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, p.p.265-275.
- Majumder R., Banik S.P. and Khowala S., 2015.** Purification and characterisation of kappa-casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091, *Food Chemistry*, 173, 441p.
- Marchesseau S., Gastaldi E., Lagaude A., Cuq J.L., 1995.** Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese.. *Journal of Dairy Sciences*, 80, p.p. 1483-1489.
- Mazorra-Manzano M. A., Perea-Gutiérrez T. C., Lugo-Sánchez M. E., Ramirez-Suarez J. C., Torres-Llanez M. J., González-Córdova A. F., Vallejo-Cordoba B., 2013.** Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry*, 141(3), p.p.1902–1907.
- Merheb C. W., Cabral H., Gomes E., & Da-Silva R., 2007.** Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, 104(1), p.p.127–131.

Merheb-Dini C., Gomes E., Boscolo M., & da Silva R., 2010. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Food Chemistry*, 120(1), p.p.87-93.

Murado Ma, Siso Mi, Gonzalez Mp, Pintado Dj., 1993. Characterization of microbial biomasses and amylolytic preparations obtained from mussel processing waste treatment, *Bioresources Technology*, 43, p.p.117-125.

Oliveira R.B.A, Margalho L.P., Nascimento J.S., Costa L.E.O., Portela J.R., Cruz A.G., and Sant'Ana A.S., 2016. Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: a review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends Food Science and Technology*, 57, p.p.11-19.

Ozturkoglu-Budak S., Wiebenga A., Bron P. A., & de Vries R. P., 2016. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 237, p.p.17-27.

Rajagopalan A., Sukumaran B.O., 2018. Three phase partitioning to concentrate milk clotting proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br and its characterization, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol.118 p.p. 279-288.

Roustel S., Boutonnier J.L. 2015. Fromage fondu : Technologie de fabrication et contrôle qualité. *Techniques de l'ingénieur*, F6311, 1, p.p.1-19.

Simon P., Meunier R., 1970. Microbiologie industrielle et génie biochimique .Ed Masson et Cie .paris. 567p.

Souza P. M., Werneck G., Aliakbarian B., Siqueira F., Ferreira Filho E. X., Perego P., Junior A. P. 2017. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, 109, p.p.1103-1110.

Talantikite-Kellil S., Nouani A., Saunier M., Gillmann L., Brahmi A and Fazouane, 2012. Isolation and identification of bacterial strain I33M producing milk-clotting enzyme: Optimization of culture parameters using response surface. *African Journal of Biotechnology* , 11(100) p.p.16594-16606.

Tsouli J., 1974. Etude comparée de l'activité de trois variétés d'artichauts du genre *Cynara scolymus* sur la coagulation du lait. *Le lait*, vol. 537, p.p. 415-421.

Vignola C.L., 2010. Science et technologie de lait : transformation du lait. Transformation du lait. Canada (Québec). 600p.

Yegin S., Goksungur Y., & Fernandez-Lahore M., 2012. Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. *Food Chemistry*, 133(4), p.p.1312–1319.

Chapitre III : Propriétés biochimiques d'une protéase produite par la Souche *Bacillus velezensis* FK6A isolée du sol d'une laiterie en vue de son utilisation pour la fabrication d'un fromage à pâte pressée cuite.

Introduction

Récemment, les protéases d'origine microbienne ont suscité un grand intérêt comme substituant de présure de veau. Les protéases fongiques, en particulier ceux de *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus* et *Endothia parasitica*, sont largement utilisés dans la production commerciale de fromage (Jacob *et al.*, 2011). En effet, certaines protéases bactériennes ont une activité coagulante élevée et des caractéristiques appropriées pour la production de fromage (Shieh *et al.*, 2009). De plus, la fermentation bactérienne submergée est plus facile à contrôler. Peu de rapports ont montré l'application industrielle de protéases bactériennes dans la fabrication de divers fromages. Par ailleurs, des études récentes ont permis de mettre en évidence les potentialités de certaines bactéries à produire des coagulases, ce sont surtout les souches du genre *Bacillus* : *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus coagulans*, qui ont fait l'objet de plusieurs études pour la production de coagulases.

C'est dans ce cadre d'investigation que nous avons entrepris l'étude d'une protéase coagulant le lait, produite par une souche bactérienne isolée localement, à savoir *Bacillus velezensis*, dont l'objectif est de mieux connaître ses potentialités coagulantes et protéolytiques et évaluer le rendement fromager comparé à celui obtenu d'une présure commerciale.

Matériel et méthodes

I- Matériel biologique

1. Méthode d'isolement de la souche

Cinquante grammes d'échantillons de sol ont été recueillis près d'une usine de production laitière dans la région de Boumerdès (au nord de l'Algérie à environ 50 km à l'est d'Alger avec des coordonnées de 36 ° 45'37.23 "N 3 ° 28'20.52" E). Une petite quantité de sol a été homogénéisée sous agitation magnétique pendant 20 min avec 90 ml d'eau physiologique stérile pour une dilution initiale (10^{-1}). Des dilutions en série ont été effectuées pour chaque échantillon et 0,1 ml de la dilution appropriée à 10^{-9} a été étalé sur un milieu d'agar de comptage de plaques (PCA) contenant 2% (p/v) d'agent antifongique d'actidione pour prévenir la croissance fongique et 12% (p/v) de lait écrémé en poudre stérile (Annexe III.1). Les plaques ont été incubées à 30°C pendant 48 h pour l'énumération de la protéase coagulant

le lait produisant une souche caséolytique par la présence d'un halo clair autour de la colonie. Les colonies ayant des différences de morphologies distinctes telles que la couleur (technique de Gram), la forme et la taille ont été sélectionnées et purifiées en utilisant le même milieu. Le pouvoir coagulant de tous les isolats a été vérifié et examiné au microscope avant les préparations du stock. Les isolats bactériens Gram positifs identifiés comme *Bacillus* ont été purifiés et les souches sélectionnées montrant une activité coagulante ont été maintenues par conservation sur gélose.

2. Identification de la souche

La procédure d'identification des souches a été développée dans nos travaux antérieurs. En bref, la macroscopie et la microscopie ont été réalisées sur des boîtes de Petri avec des plaques de l'agar de comptage (PCA) sur des colonies de 24h. Pour l'analyse de séquençage, l'ADN génomique a été extrait de la souche par la méthode standard d'alcool isoamylique au chloroforme en utilisant un kit de réactif PrepMan ultra-échantillon (Applied Biosystems, Thermo Fischer scientifique, France) et purifié sur des plaques NucleoFast (Macherey Nagel). L'amplification de l'ADNr 16S a été réalisée par une technique de PCR, en utilisant de l'ADN polymérase Taq, l'ADN génomique comme modèle et des amorces universelles à 3 et 5 inversées. Les séquences de ces amorces utilisées sont les suivantes: F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), R1 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), F2 (5'-CTCCTACGGGAGGAGCAG-3') et R2 (5'-GACACGAGCTGACGACA-3'). Les produits de PCR ont été séquencés par la technique de Sanger dans les conditions optimisées par Geno-screen (Geno-screen Campus de l'Institut Pasteur de Lille 1, rue du Professeur Calmette - 59000 Lille - France. Après, en recevant les résultats du séquençage, la séquence de nucléotides du 16S rDNA (Séquence de 915 pb) de la souche ont été déposés dans GenBank et alignés sur les séquences d'ADNr 16S disponibles dans les bases de données publiques du Centre National d'Information sur la Biotechnologie (NCBI) (Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), et la base de données LeBibi (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebib/lebib.cgi>) en utilisant le logiciel BLAST (Basic alignment search tool).

3. Préparation de l'inoculum

La souche *Bacillus velezensis* est activée par incubation à 30°C pendant 24 heures. Puis elle est submergée de solution stérile d'eau physiologique (10 ml dans un tube à essai). A l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose (P.C.A.) afin de mettre en suspension les bactéries. Ensuite, la suspension est ajustée au standard Mc Farland de 5 à l'aide d'un spectrophotomètre UV Visible, ce qui correspond à une densité optique

(DO) de 0.9 nm à une longueur d'onde de 600 nm. Le 5 Mc Farland est équivalent à 15×10^8 CFU/ml. Le nombre de bactéries est vérifié par un dénombrement sur milieu coulé (P.C.A) en boîte de pétri.

4. Préparation et inoculation du milieu de culture

Pour la fermentation, le milieu de culture choisi est un milieu semi-solide à base de son de blé, préconisé par **Rao et Mathur (1976)**. Il est favorable à la production de protéases extracellulaires et il assure une forte production en métabolites. Ce milieu est composé de : Son de blé : **50g/l**; Extrait de levure : **3g/l** ; Glucose : **4 g/l** ; caséine : **2 g/l**; Na_2HPO_4 : **3g/l**. Le son de blé a été signalé comme un milieu idéal de production de protéase pour les micro-organismes (**Hang et al., 2016**).

4.1.Méthode de préparation et d'inoculation du milieu de culture

Le son du blé est distribué dans des Erlenmeyers à 250 ml à raison de 2.5 g supplémenté de 0.15 g d'extrait de levure, 0.2 g de glucose, 0.1g de caséine et 0.15 g de Na_2HPO_4 dans 50 ml d'eau distillé. Les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé enveloppé dans un filet de gaze et coiffés de papier aluminium (qui supporte une bonne étanchéité et supporte les hautes températures) ils sont alors stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn, puis on introduit dans chaque erlenmeyer 3 ml de l'inoculum. L'incubation a lieu à 30°C pendant 24 heures sous agitation moyenne à 110 tours / mn (**Poza et al., 2003**).

4.2.Conditions de fermentation : étude préalable

Une étude concernant les conditions de fermentation de l'enzyme a été entreprise sur le milieu de culture proposé par **Rao et Mathur (1976)** afin d'optimiser le temps de coagulation et la quantité de son du blé et pouvoir ainsi augmenter la concentration de l'extrait coagulant et diminuer le temps de coagulation. Nous avons réalisé 4 essais avec 3 répétitions pour chaque essai afin d'optimiser les deux paramètres (le temps de coagulation et la quantité de son du blé):

- Essai n°1 : **2.5g** de son du blé, temps d'incubation **24 h** ;
- Essai n°2 : **2.5g** de son du blé, temps d'incubation **36 h** ;
- Essai n°3 : **5g** de son du blé, temps d'incubation **24 h** ;
- Essai n°4 : **5g** de son du blé, temps d'incubation **36 h**.

II- Caractérisation de l'extrait enzymatique brut (EEB)

1. Extraction de l'enzyme coagulante

Pour la récupération de l'extrait enzymatique brut, on procède d'abord à une filtration du contenu des erlenmeyers incubés sur gaze dans une hôte stérile, entreposée sur un entonnoir. Le filtrat est ensuite soumis à une centrifugation à 4000 trs/min pendant 30 min à 4°C (**Rao et Mathur, 1976**). Le surnageant récupéré constitue l'extrait enzymatique brut (**figure n°49**).

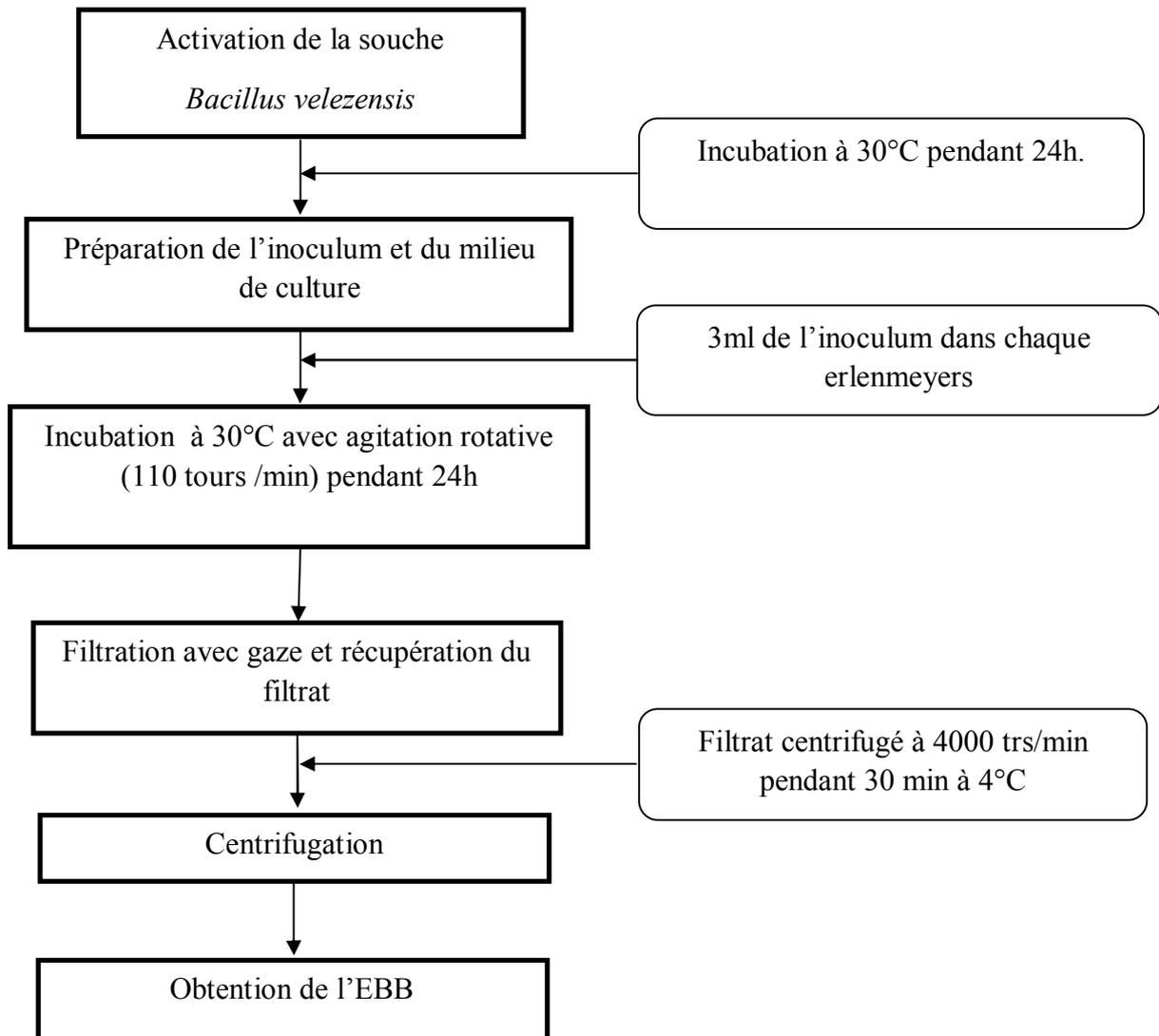


Figure n°49: Protocole d'obtention de l'extrait enzymatique brut produit par la souche *Bacillus velezensis*.

2. Mesure des activités enzymatiques

- **Mesure de l'activité coagulante (AC)** (*Voir chapitre I, page 40*).
- **Mesure de l'activité protéolytique (AP)** (*voir chapitre I, page 41*).

3. Détermination de l'indice AC/AP

Selon **Abdelfattah et El-Hawwary (1974)** et **Abdelfattah et al. (1990)**, le rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique (AC/AP), pour les préparations enzymatiques, représente un indice d'appréciation de la qualité des présures de remplacement par rapport à la présure de référence. Sa mesure permet de déterminer l'aptitude d'une préparation enzymatique à coaguler le lait au même titre que la présure.

4. Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants est réalisé selon la méthode de **Lowry (Lowry et al., 1951)** (*Annexe I.3*).

5. Détermination des conditions optimales de l'activité coagulante

L'activité coagulante du lait dépend fortement de plusieurs paramètres, notamment, la température, le pH, concentration en CaCl_2 du lait et la concentration en enzyme. La mesure de l'activité en fonction de ces différents paramètres est déterminée dans les conditions standards du substrat de Berridge (35°C , pH 6.4, CaCl_2 à 0.01M).

L'activité coagulante est exprimée en unité de présure (UP) dont la plus forte activité est celle qui correspond au temps de coagulation le plus court.

Pour l'évaluation de l'influence des différents paramètres sur l'activité coagulante, nous avons effectué 3 mesures par essai. (*Voir chapitre I, page 44*).

6. Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique brut

L'évaluation de la stabilité des extraits enzymatiques consiste à exposer les enzymes aux paramètres température et conservation.

➤ **Stabilité thermique des enzymes**

L'étude de la thermo-résistance des extraits coagulants est effectuée en plaçant une même quantité d'extrait enzymatique en solution dans un bain marie à différentes températures de 30 à 80°C pendant une durée de 30 min.

➤ Stabilité des enzymes au cours de la conservation

Les extraits coagulants sont entreposés à différentes températures de congélation (-18°C) et de réfrigération (+ 4°C) pendant une période de 40 jours. L'activité coagulante est mesurée périodiquement (une fois chaque 10 jours) selon les conditions standards.

7. Analyse statistique

Les résultats obtenus après la mesure de l'activité coagulante pour chaque paramètre étudié (température, pH, CaCl₂, concentration en extrait enzymatique) sont exprimés sous cette forme : **moyenne ± écart type**. Afin de déterminer la significativité de chaque paramètre étudié et de maximiser l'activité coagulante de l'EEB, on a procédé à une analyse statistique de régression linéaire multiple à l'aide d'un logiciel SPSS version 21.0 avec un seuil de signification statistique fixé à 0.05 ($p \leq 0.05$).

8. Effet de quelques effecteurs sur l'activité coagulante

L'effet des inhibiteurs de l'enzyme a été mesuré selon la technique décrite par **Raposo et Domingos (2008)**. Pour étudier l'impact de différents inhibiteurs sur l'activité coagulante de la protéase, l'activité résiduelle a été estimée après une pré- incubation de l'extrait enzymatique brut à 37°C pendant 30 min avec des inhibiteurs dans les conditions décrites par **He et al. (2011)**. Les inhibiteurs étudiés sont : la pepstatine A à 0,1 et 0.2 mM (inhibiteur des aspartates protéases), l'éthylène diamine tétraaceticacid (EDTA) (inhibiteur des metalloprotéases) à 5mM et à 10 mM. L'effet de l'inhibiteur sur l'activité enzymatique représente l'activité résiduelle relative rapportée à l'activité initiale de l'enzyme exprimée en %. L'activité témoin de l'enzyme sans effet de l'inhibiteur représente 100% d'activité.

III- Purification de l'extrait enzymatique brut

L'extrait coagulant issu de *Bacillus velezensis* a été partiellement purifié par les méthodes suivantes :

- Précipitation au sulfate d'ammonium ;
- Dessalage de l'extrait enzymatique par dialyse ;
- Chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphadex G-75.

1. Précipitation au sulfate d'ammonium

➤ Principe

Le sulfate d'ammonium provoque, dans une solution protéique, une déshydratation et une précipitation des protéines induisant ainsi le phénomène de relargage (**Annexe II.2**).

L'avantage du relargage est que les protéines conservent leur conformation native et peuvent être ensuite dissoutes habituellement sans dénaturation. Le choix s'est porté sur le sulfate d'ammonium du fait de sa solubilité dans l'eau et de sa force ionique élevée (**Kamoun, 1977**).

2. Dessalage de l'extrait enzymatique par dialyse

➤ Principe

La dialyse est une technique de séparation qui permet d'éliminer d'une solution macromoléculaire des ions ou petites molécules, par leur passage à travers une membrane semi-perméable (boudin). Les protéines, par leurs poids moléculaires élevés, ne sont pas diffusibles.

➤ Méthode

Le boudin est préparé dans des solutions différentes, puis il sera rempli par la solution de protéines précipitées par le sulfate d'ammonium est fermé à ses deux extrémités et maintenu en suspension dans la solution de dialyse. La dialyse est effectuée contre de l'eau distillée à 4°C et sous agitation moyenne. Cette eau est régulièrement renouvelée. Après 48 heures de dialyse, le culot est récupéré pour la suite de notre étude.

3. Chromatographie d'exclusion moléculaire (Gel filtration)

La **figure n°50**, représente le dispositif expérimental employé pour la purification des extraits enzymatiques par chromatographie d'exclusion moléculaire.

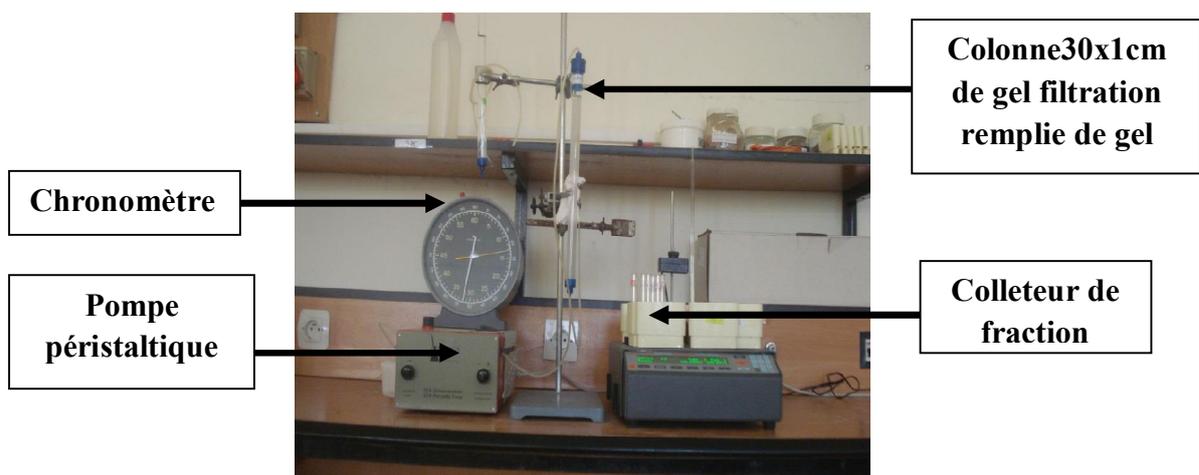


Figure n°50: Dispositif expérimental de gel filtration.

L'extrait concentré a été chargé sur une colonne de Sephadex G-75 (30 cm x 1,5 cm) pré-équilibrée avec du tampon acétate (0,01 M, pH 5,5). Des fractions enzymatiques de 1,5 ml ont été éluées à un débit de 36 ml / h avec le même tampon et ont été analysées pour déterminer

l'activité enzymatique et la teneur en protéines. Les fractions enzymatiques actives ont été regroupées et lyophilisées pour des études ultérieures.

4. Estimation du poids moléculaire

Le poids moléculaire de la protéase obtenu après purification partielle des extraits enzymatiques bruts de *Bacillus velezensis* a été estimé à partir du profil d'un mélange de protéines standards par passage sur colonne Séphadex G-75 dans les mêmes conditions (1 : **Bovin sérum albumin (67 kDa)**, 2 : **Ovalbumine (40kDa)**, «3 : **Carbonic anhydrase (30kDa)**, 4 : **trypsine (23.8k Da)**). La droite de régression est représentée par la valeur du logarithme de la masse moléculaire de la protéine étalon (logPM) en fonction de son volume d'éluions (V_e) (**Figure n°51**). Cette méthode de mesure est la technique classique de mesure du PM d'une protéine en biochimie (**Kamoun, 1977**).

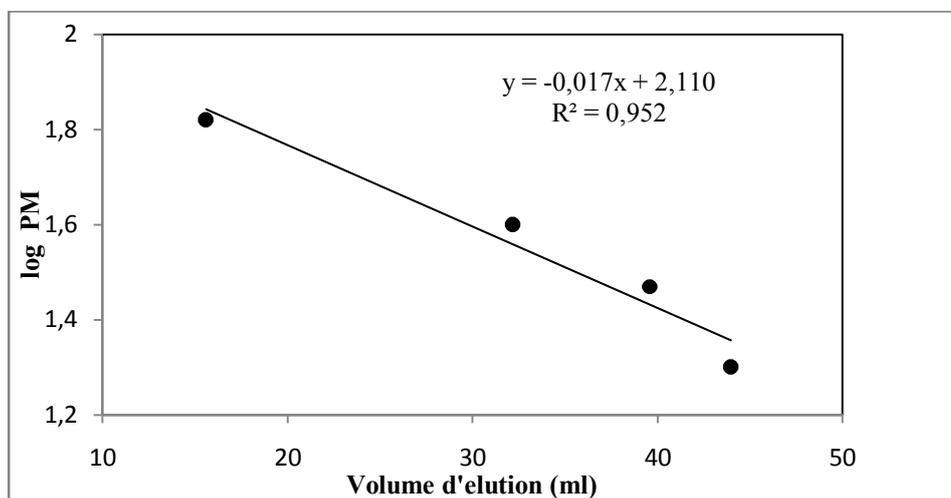


Figure n°51: Droite de régression du logarithme des protéines marqueurs en fonction de leur volume d'éluion par passage sur colonne séphadexG-751 : BSA, 1; Bovin sérum albumine (67 KDa), 2:Ovalbumine (40KDa), 3: anhydrase Carbonique (30kDa) ,4: trypsine (23.8 KDa).

IV- Essai de fabrication du fromage à pâte pressée cuite par l'utilisation de l'EEB

1. Etapes de fabrication du fromage

L'essai de fabrication de fromage a pour objectif principal l'étude des aptitudes à la coagulation du lait de l'enzyme extraite en comparaison avec la présure commerciale. Cet essai a été effectué au sein du laboratoire de microbiologie du département de technologie alimentaire à l'ENSA.

Etant donné, l'activité fortement protéolytique de l'extrait enzymatique de *Bacillus Velezensis*, nous avons choisi d'élaborer un fromage de type pâte pressée cuite, afin d'inhiber cette activité juste après coagulation, et limiter ainsi les pertes en rendement fromager.

Nous avons élaboré trois types de fromage à pâte pressée cuite dans les mêmes conditions se différenciant par :

- **Type 1** : coagulation par EEB ;
- **Type 2** : coagulation par présure ;
- **Type 3** : coagulation par mélange (EEB+présure) (50/50).

Nous avons utilisé un volume total de lait de vache de 6 litres issu d'une ferme de la région de Timezrit, Bejaia. Celui-ci est subdivisé en trois bacs de 2 litres de contenance. Le procédé de fabrication utilisé a été proposé par **Harbutt (2010)** pour les fromages à pâte pressée cuite (**figure n°52**).

1.1. Préparation du lait

La préparation du lait consiste à la pasteurisation du lait à 80°C pendant 20 secondes afin d'éliminer tous les germes pathogènes. Après refroidissement du lait à 42°C, on ajoute 2.5 g de CaCl₂ et 2 g de yaourt afin d'ensemencer le milieu avec les ferments lactique (mésophiles) plus précisément *Streptococcus thermophilus* qui intervient dans l'affinage des fromages à pâte pressée et d'amener le lait à son pH d'emprésurage, et enfin la maturation des ferments à 42°C pendant 1h.

1.2. Emprésurage

Cette étape est réalisée quand le pH est d'environ de 6.4 et à la température de 42°C pour la présure et le mélange (EEB + Présure) et à 55°C pour les extraits enzymatiques bruts.

La dose des différents extraits coagulant additionnés pour chaque deux litres de lait est calculée préalablement à partir de la force coagulante (F) de chacun :

- F présure = 1/1333 → Dose = 1.5 ml /2 l → Temps de coagulation= 3 à 6 min
- F (EEB) = 1/44.44 → Dose = 45 ml /2 l → Temps de coagulation=10 à 15min
- F mélange= 1/1846 → Dose = 1.01 ml /2 l → Temps de coagulation= 2.5 à 5min

1.3. Découpages, brassage et lavage du caillé

Cette étape consiste à découper le caillé en petits cubes réguliers puis brasser avec une louche afin d'éviter la soudure des grains de caillé et accentuer leurs assèchement. Ensuite vient l'étape de lavage du caillé qui consiste à remplacer une partie du sérum par de l'eau pour

abaisser la richesse du caillé en lactose afin d'éviter une sur acidification (réduire l'acidité par l'ajout de l'eau).

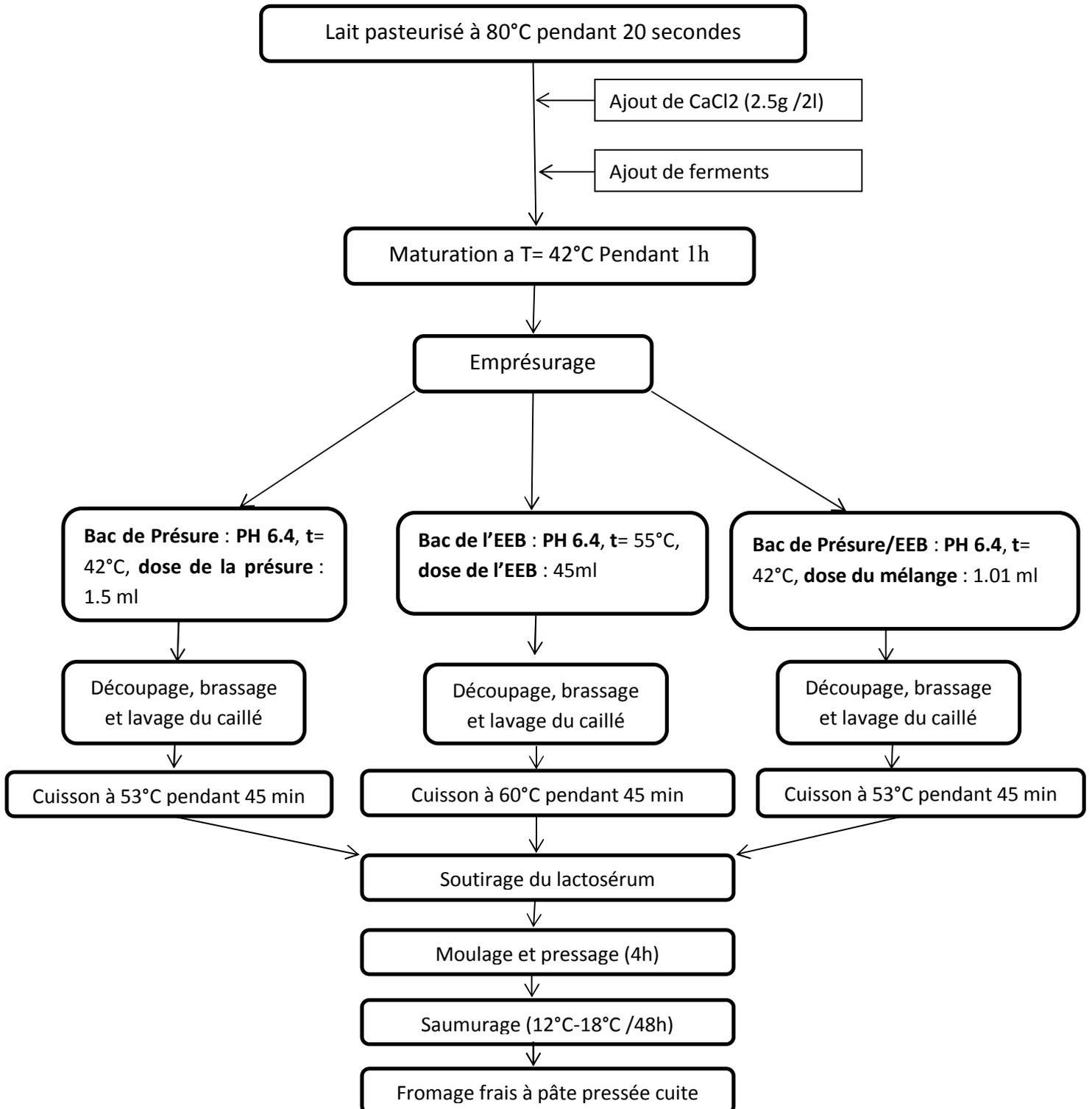


Figure n°52: Etapes de fabrication du fromage à pâte cuite pressée (Harbutt, 2010).

1.4. Cuisson du caillé

Le caillé subit un chauffage après son lavage, pour le caillé à base de présure et du mélange la température de cuisson est de 53°C pendant 45 min quant au caillé à base de l'EEB sa température de cuisson est de 60°C pendant 45min, dont une partie de la flore lactique est détruite.

1.5. Prépressage, moulage, pressage

Après la cuisson du caillé, il est pressé à l'aide d'une toile pour permettre un égouttage sans qu'il y ait une perte de caillé, puis il est mis dans des moules troués, munis d'une toile. Enfin les moules sont pressés à l'aide d'une plaquette massive pendant 4 heures, afin d'augmenter l'extrait sec et de favoriser l'expulsion du sérum résiduel et donner une bonne texture au fromage.

1.6. Saumurage

Une fois pressées, les boules de fromage sont démoulées et immergées dans un bain de saumure (20 % de sel) entre 14 et 18°C pendant 48h. Le sel joue un triple rôle :

- Il complète l'égouttage et contribuera ainsi à la formation de la croûte.
- Il règle l'activité de l'eau en freinant le développement des microorganismes et en régulant les activités enzymatiques.
- Il révèle la saveur propre du fromage en influençant le goût et en renforçant les arômes.

2. Analyses physico-chimiques du fromage

➤ pH

La mesure de pH du fromage réalisé est effectuée par l'emploi d'un pH-mètre, et cela par l'immersion de son électrode dans la croûte de l'échantillon de fromage. La valeur du pH est directement lue sur l'appareil.

➤ Extrait sec total du fromage

Un échantillon de 1 g de fromage est soumis à une dessiccation à 105°C à l'aide d'un dessiccateur muni d'une balance. L'extrait sec total est exprimé en pourcentage de la masse du résidu.

➤ Matière grasse

La teneur en matière grasse du fromage est déterminée par l'utilisation de la méthode acido-butyrométrique de Van Gulik (AFNOR, 1993) (Annexe I.5).

➤ **Extrait sec dégraissé (ESD)**

L'extrait sec dégraissé exprime la différence entre l'extrait sec total du produit et sa matière grasse. Il est donc déterminé par la formule suivante : $ESD(\%) = (EST - MG) \times 100$

➤ **Rendement fromager**

Le rendement fromager ou le rendement de la transformation du lait en fromage est l'expression mathématique de la quantité de fromage obtenu à partir d'une quantité donnée de lait (souvent 100 L ou 100Kg) (Vandewgh, 1997). Il est déterminé par la formule suivante : $Rdt = 10 \times ESD \times Pds/V$

Rdt : Rendement fromager ;

ESD : Extrait sec dégraissé ;

Pds : Poids ;

V : Volume du lait mis en œuvre.

3. Analyse sensorielle du fromage

L'objectif de cette analyse consiste à décrire les caractéristiques sensorielles du fromage fabriqué soit la texture, la couleur, goût du fromage provoquant des réactions plus ou moins vives d'acceptation ou de rejet.

Le test de dégustation est mené sur trois (03) échantillons du fromage fabriqué (type pâte pressée cuite) :

- ✓ Le premier fabriqué avec la présure commerciale
- ✓ Le deuxième fabriqué à partir de l'extrait enzymatique brut de *Bacillus velezensis*.
- ✓ Le troisième fabriqué à partir d'un mélange de présure commerciale et de l'extrait enzymatique brut de *Bacillus velezensis*.

La différence statistique entre les lots est évaluée à l'aide du Quick Rank Test de KRAMER (Kramer, 1960) basé sur la somme des rangs (Annexe I.6). Le seuil de probabilité est de 5% ($p = 0.05$).

Résultats et discussion

I- Identification de la souche

L'identification de la souche par le produit de PCR a été examinée par électrophorèse, purifiée, puis séquencée par Geno-screen (Campus de l'Institut Pasteur de Lille, France). En plus de l'identification biochimique et morphologique, le gène rADN 16S a été amplifié avec succès à partir de l'ADN génomique de la souche FK6A (**figure n°53**).

```
CGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAA
ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTACTC
CCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACT
CATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGC
GTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCT
ACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGA
GCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCCAATAATTCCGGACA
ACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTAC
CGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTCTTCCCTAACACAGAGCTTACGATCCGAAAA
CCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATCCCTACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACC
```

Figure n°53: séquençage de la souche FK6A.

La base de données nucléotidique a montré une homologie à 100% avec la souche de *B. velezensis* sur un fragment de 724pb. Par conséquent, notre souche a été désignée *B. velezensis* FK6A avec le numéro d'accès (accession number) **MH368142** et les bases de données nous ont permis d'élaborer un dendrogramme phylogénétique pour FK6A et des souches apparentées (**figure n°54**).

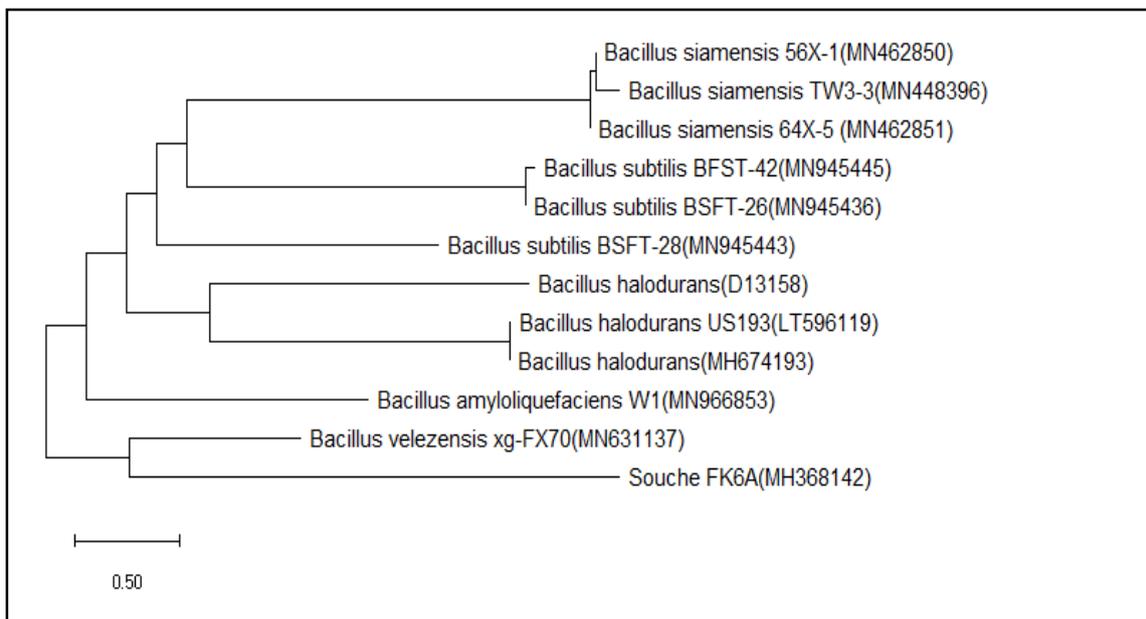


Figure n°54: arbre phylogénétique de la souche FK6A.

II- Production d'enzyme coagulant le lait

1. Conditions de fermentation

D'après l'étude préalable entreprise sur les conditions de fermentation de la souche *Bacillus velezensis*, il s'est avéré que les conditions optimales sont : **5g** de son du blé et un temps d'incubation de **36 h** avec un temps de coagulation de **4 ±1min (tableau n°28)**.

Donc nous avons opté pour ces conditions de fermentation pour la production de l'extrait enzymatique brut.

Tableau n°28: Conditions optimales de fermentation de la souche *Bacillus velezensis*.

Essai	2.5g/24h	5g/24h	2.5g/36h	5g/36h
Temps de coagulation	20±5min	15±3min	7±2min	4±1 min

2. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

2.1. Activité coagulante de l'EEB

Après l'extraction, l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut issue de *Bacillus velezensis* a été déterminée par les méthodes de Soxhlet et de Berridge.

La force coagulante de l'extrait brut est de l'ordre de $1/122.05 \pm 3.29$ ce qui indique qu'un ml d'extrait enzymatique coagule 122.05 ± 3.29 ml de substrat de Berridge.

Comparée aux activités de présure bovine de référence et aux données bibliographiques relatives au genre *Bacillus*, la force coagulante obtenue est relativement faible (**tableau n°29**), cette différence pourrait s'expliquer par les conditions de fermentation.

Tableau n°29: Comparaison de l'AC de l'EEB aux autre AC des coagulases du genre *Bacillus* et de la présure bovine.

coagulases	AC (US)	Référence
EEB <i>Bacillus velezensis</i>	122.05 ± 3. 29	Notre échantillon
Présure	537±1.8	(Shieh <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus subtilis</i> natto	182	(Shieh <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> D4	4645.16	(He <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus subtilis</i> B1	782	(Ding <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus</i> sp. P45	239	(Lemes <i>et al.</i> , 2016)
<i>Bacillus mojavensis</i> P47M	5400	(Kahlouche et Noauni , 2017)

En effet, selon **Ding *et al.* (2011)** l'activité coagulante d'un extrait enzymatique est influencée par de nombreux facteurs du milieu entre autre la concentration en glucose, la taille de l'inoculum, le temps d'incubation, le volume du milieu. Cette observation impose une optimisation du milieu de culture.

2.2. Activité protéolytique, indice AC/AP et teneur en protéine de l'EEB

Au cours de la coagulation du lait, il est impératif de connaître le degré de protéolyse engendré par les enzymes coagulantes qu'elles soient animales, microbiennes ou végétales.

En effet, une activité protéolytique trop élevée est à l'origine du développement d'amertume retrouvée dans les produits fromagers.

Les résultats de l'activité protéolytique et le rapport AC/AP de l'EEB sont indiqués par le **tableau n°30**.

Tableau n°30: Activité protéolytique, rapport AC/AP et teneur en protéine de l'EEB.

Paramètres Coagulase	Activité coagulante(US)	Activité protéolytique (DO _{660nm})	Ratio (AC/AP) (US/DO _{660nm})	Teneur en protéine mg/ml
EEB	122,05±3,29	0.362±0.001	338.12	76.6
Présure (Chwen <i>et al.</i> , 2010)	537±1.8	0.115±0.002	4669,6	-

Les résultats du **tableau n°30** montrent que l'activité protéolytique obtenue par l'EEB est forte par rapport à la présure de référence, par ailleurs, cette activité est proche de celle obtenue par *Bacillus subtilis* var natto et *Rhizopus oligosporus* qui sont respectivement de l'ordre de 0.440±0.009 et 0.392±0.001 (**Chwen *et al.*, 2010**).

Le rapport de l'activité coagulante à l'activité protéolytique d'une enzyme est son indice d'adéquation pour être un succédané de la présure (**Abdel-Fattah et El-Hawwary, 1974**). En effet, le ratio AC/AP obtenue par l'EEB est beaucoup plus faible par rapport à celui obtenu par **Chwen *et al.* (2010)** pour la présure, ceci indique que l'activité protéolytique de l'EEB est élevée. Par ailleurs, dans une étude similaire sur la protéase issue de *Bacillus subtilis*, **Puhan et Irvine (1973)** et **Pant *et al.* (2015)** ont observé un fort pouvoir protéolytique, les auteurs

ont alors suggéré de combiner l'enzyme bactérienne avec la présure commerciale (avec un rapport 1/1) afin d'améliorer le rendement fromager.

La teneur en protéines de l'EEB déterminée par la méthode colorimétrique de **Lowry et al. (1951) (Annexe I.3)** est de l'ordre de 76.6 mg/ml. Dans des études similaires sur *Bacillus subtilis* AU-2, **Patel et al. (2019)** indiquent des concentrations en protéines plus importantes par rapport à celle obtenue par l'EEB de *Bacillus velezensis*.

En outre il faut signaler que la teneur déterminée représente les protéines totales. La séparation lors d'une purification des diverses protéines permettra de mesurer la concentration des protéines coagulantes recherchées.

2.3. Conditions optimales de l'activité coagulante

➤ Influence de la température sur l'activité coagulante de l'EEB

La détermination de la température optimale du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut (EEB) de la souche *Bacillus velezensis* a été étudiée à des températures allant de 30°C à 85°C par un palier de 5°C.

Les résultats obtenus lors de notre expérimentation font apparaître que l'activité coagulante augmente progressivement avec l'élévation de la température pour atteindre son optimum au voisinage de 75°C (533,33US). Au-delà de 75°C on note une baisse rapide de l'activité coagulante, puis s'annule à 85°C (inhibition total de l'enzyme).

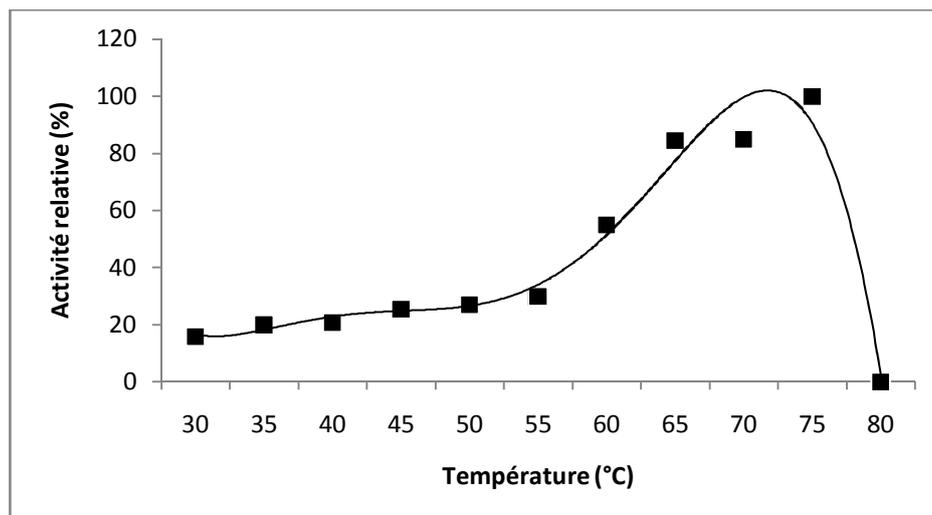


Figure n°55: Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de l'EEB.

La valeur de température optimale de notre extrait enzymatique brut est identique à celle rapportée **Ahmed et Helmy, (2012)** pour la souche *Bacillus licheniformis* 5A5.

Pant et al. (2015) ont observé une activité optimale chez *Bacillus subtilis* à une température de 50°C. Ainsi, **Poza et al. (2003)** ont enregistré une température optimale à 37°C pour la protéase de *Myxococcus xanthus*. Cependant une température optimale de 60°C est observée chez la protéase *Rhizopus ryzae*, *Penicillium oxalicum* et *Cryptococcus albidus* (**Kumar et al., 2005**).

En général, les extraits enzymatiques d'origine animale ont une activité importante à des températures modérés cependant les coagulases d'origine microbienne et végétale se montrent plus actives aux températures élevées (**Talantikite, 2015**).

➤ Influence du pH sur l'activité coagulante de l'EEB

L'activité coagulante est examinée dans le gradient de pH allant de 5.7 à 8.1 avec un pallier de 0.2. L'observation de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique n'a pu se faire qu'à partir d'un pH de 5.7, car en dessous de ce pH, le lait coagule avant l'addition de l'extrait enzymatique (coagulation acide). Cependant, l'activité maximale a été observée à pH 5,7 avec une activité coagulante de 155,55 US. Au-delà de ce pH on observe une chute graduelle de l'activité coagulante, puis elle s'annule au pH de 8.1. Le pH du lait a une grande influence sur les propriétés de gélification des coagulants (**Esteves et al., 2003**).

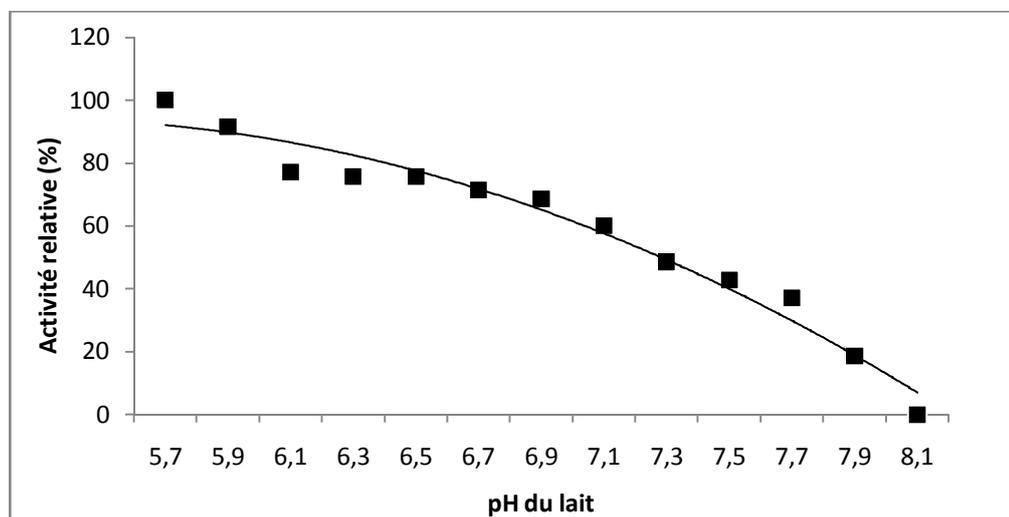


Figure n°56: Effet du pH sur l'activité coagulante de l'EEB.

Selon **He et al. (2011)**, l'activité coagulante optimale de l'enzyme obtenue à partir de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* D4 est à pH de 5.5, puis elle est inactivée à pH de 8, ce qui se concorde avec nos résultats.

Le même résultat a été observé pour les enzymes coagulant le lait de *B. subtilis natto* étudiées par **Schieh et al. (2009)** et **Li et al. (2012)** et pour *Bacillus licheniformis* BL312 étudiée par **Zhang et al. (2019)**. Par contre **Pant et al. (2015)** ont trouvé une activité optimale à pH 7,4 pour la protéase issue de *Bacillus subtilis*. Ainsi, **Bey et al. (2018)** ont montré que le pH optimal est de 6,4 pour l'extrait enzymatique de *Foeniculum vulgare*.

➤ **Influence de la concentration en CaCl_2**

La concentration du calcium ionique dans le lait est corrélée avec les propriétés de sa gélification, où une concentration plus élevée en cet élément aboutit à des temps de gélification plus courts et une plus grande résistance et fermeté des gels (**Glantz et al., 2011**).

Pour étudier l'influence du calcium sur l'activité coagulante de la protéase de *Bacillus velezensis*, le calcium a été ajouté au lait sous forme de chlorures de calcium CaCl_2 , tout en faisant varier la concentration de ce dernier de 10 à 80 mM.

Les résultats illustrés par **la figure n°57** montrent que l'activité coagulante de la protéase croît avec la concentration en CaCl_2 jusqu'à atteindre une valeur optimale de l'ordre de 40mM, au-delà de cette valeur, l'activité coagulante diminue par un effet inhibiteur de l'ion calcium.

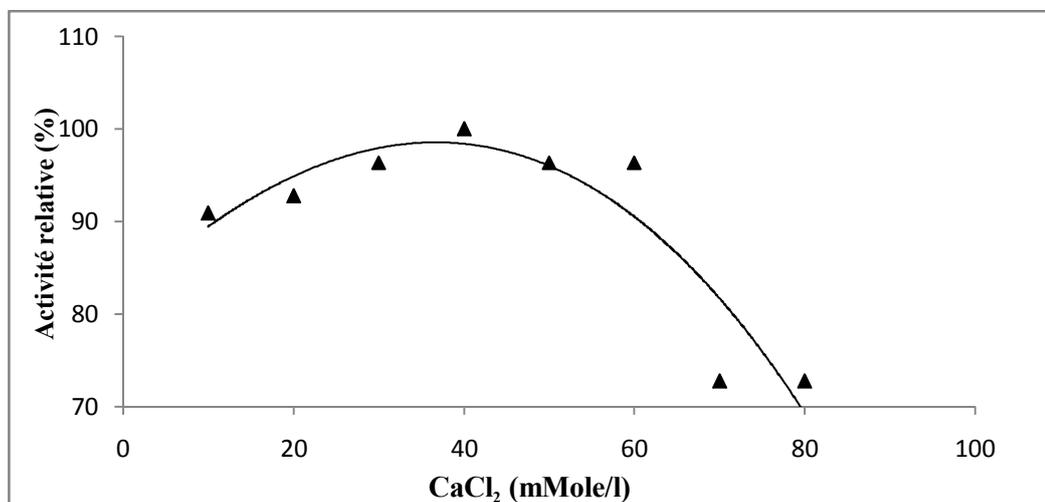


Figure n°57: Effet de la concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante.

Dans une étude similaire sur la coagulase de *Bacillus mojavensis*, **Talantikite et al. (2012)** ont obtenu le même résultat. En outre, **Ding et al. (2011)** et **Zhang et al. (2019)** ont rapporté une activité optimale de 50 mM pour les protéases de *Bacillus subtilis* B1 et *Bacillus licheniformis* BL312 respectivement. En effet, les enzymes d'origine microbienne sont les plus sensibles à la baisse des concentrations en CaCl_2 .

➤ Influence de la concentration en extrait enzymatique brut

L'activité des extraits coagulants, en fonction de la concentration en extrait, a été estimée en mesurant le temps de coagulation pour des concentrations variables en protéines de l'extrait de 15.34 mg/ml à 76.7mg/ml.

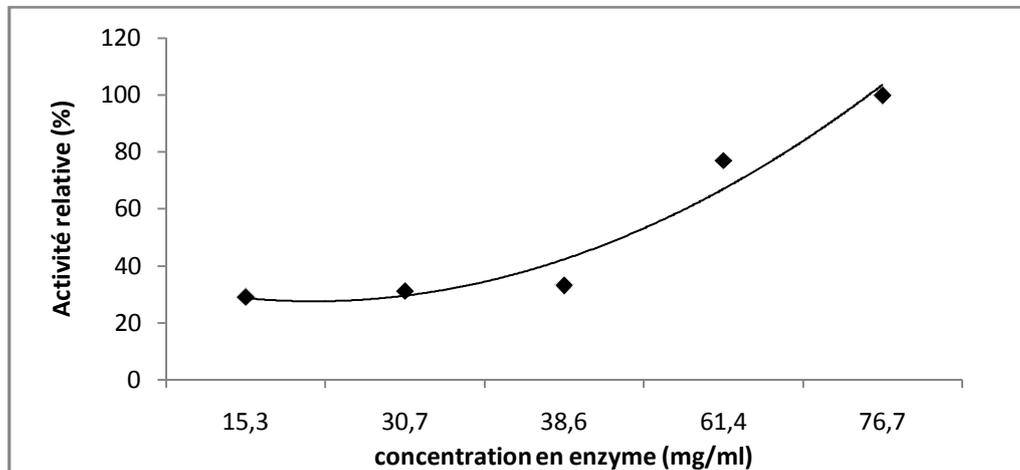


Figure n°58: Influence de la concentration en extrait coagulant sur l'activité coagulante.

Les résultats représentés par **la figure n°58** montrent une augmentation progressive de l'activité coagulante au fur et à mesure de l'accroissement des concentrations de l'extrait. Cependant, dans l'intervalle de concentration testé, nous n'avons pas observé de pallier correspondant à une concentration saturante en enzyme. Auparavant, **Van Hooydonk et Walstra (1987)** et **(Payens *et al.*, 1977)** considèrent que le temps de coagulation est en fonction de la concentration enzymatique.

2.4. Etude de la stabilité de l'EEB

➤ Stabilité thermique de l'EEB

L'influence de la température sur la stabilité thermique de l'extrait enzymatique brut a été étudiée en maintenant notre extrait à des températures variant dans l'intervalle de 30°C à 60°C. Le temps d'exposition est de 30 min.

Les résultats illustrés par **la figure n°59**, montrent une stabilité à 35°C avec une activité coagulante de 108.88US, pour des températures supérieures à 35°C, cette activité diminue progressivement, puis s'annule à 60°C (inhibition totale des protéines enzymatiques).

Nouani *et al.* (2009), rapportent une température de stabilité maximale comprise entre 30°C et 40°C pour la présure commerciale et de 30°C à 50°C pour les protéases de *Mucor pusillus*

pendant 30 min d'incubation. Cependant **He et al. (2011)**, ont signalé une stabilité à 35°C pendant 60 min pour les coagulases de *Bacillus amyloliquefaciens* D4, elle est plus stable par rapport à notre coagulases étudiée mais elle est inhibée à 55°C pendant 20 min. **Shieh et al. (2009)**, ont observé une stabilité à 55°C pendant 40 min pour la protéase de *Bacillus subtilis* natto puis elle est inhibée à 65°C pendant 30 min. Par ailleurs, **Badgujar et al. (2014)** montrent une médiocre stabilité thermique pour la protéase de latex de *Euphorbia nivulia* car seulement 52% de son activité était conservée après 30 min d'incubation à 50 °C.

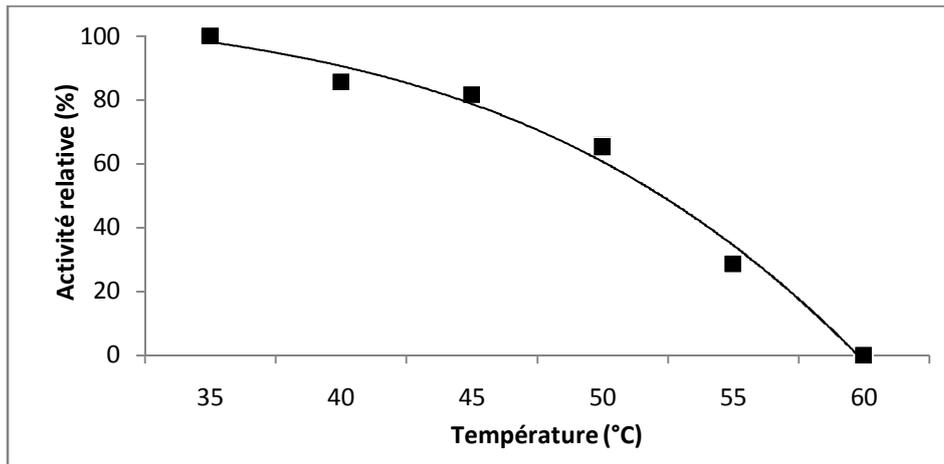


Figure n°59: Stabilité thermique de l'extrait enzymatique brut après 30 min d'incubation.

➤ **Stabilité au cours de la conservation à 4°C et -18°C**

Pour estimer le temps à la conservation de notre enzyme à l'état brut, cette dernière a été entreposée à la température de 4°C et -18°C pendant 40 jours de stockage. A cet effet, la mesure de l'activité coagulante est effectuée périodiquement (chaque 10 jours).

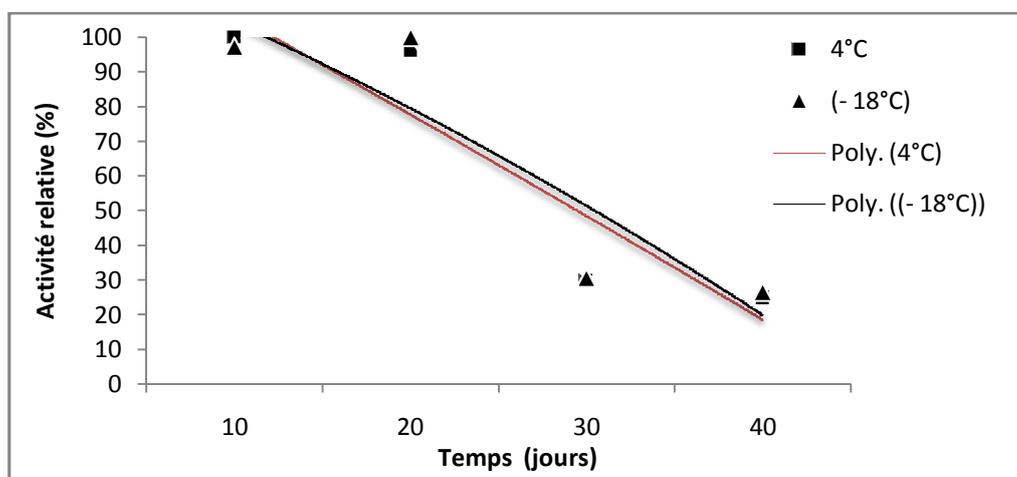


Figure n°60: Stabilité de l'extrait enzymatique brut au cours de la conservation.

Les résultats, illustrés par **la figure n°60**, indiquent une baisse de l'activité à partir du vingtième jour de conservation à +4° C et même à -18°C, et ce, jusqu'à atteindre une valeur d'activité inférieure à 42.5US. Au-delà de cette valeur, et jusqu'en fin de durée de conservation, l'activité coagulante de la protéase de *Bacillus velezensis* continue à baisser progressivement de la même manière quoique soit la température (+4°C, ou -18°C) à laquelle l'extrait enzymatique est soumis. Par ailleurs, **Ahmed et al. (2016)** ont montré que l'extrait enzymatique de *Bacillus stearothermophilus* a conservé toute son activité à -18°C qu'à 4°C pendant 30 à 40 jours.

A partir de ces résultats obtenus (**figure n°60**), on peut conclure, que l'enzyme de *Bacillus velezensis* est indifférente aux conditions de conservation (température) c'est-à-dire que son activité coagulante ne peut être affectée et déstabilisée que par la longueur de la durée de conservation. Par ailleurs, et comme l'activité coagulante ne reste stable que pour une courte durée de conservation (moins de 20 jours), on peut dire que l'enzyme coagulante extraite à partir de *Bacillus velezensis* est peu stable durant la conservation dans nos conditions.

2.5. Effet de quelques effecteurs sur l'activité coagulante

Dans le but de poursuivre la caractérisation biochimique de l'extrait brut de *Bacillus velezensis* et de déterminer le groupe d'appartenance de la protéase coagulante, deux inhibiteurs de deux types de protéases ont été testés, soit ceux des protéases à aspartate (pepstatine A) et ceux des metalloprotéases (EDTA) tel qu'illustré dans **le tableau n°31**.

Tableau n°31: Effet des inhibiteurs sur l'activité coagulante de l'EEB.

Inhibiteurs	Concentrations (mMol/l)	Temps de coagulation (mn)	AC relative résiduelle (%)
Témoin	0	6.30	100
Pepstatine A	0.1	7.30	86.30
	0.2	12.20	51.64
EDTA	5	0	0
	10	0	0

D'après les résultats du **tableau n°31**, la pepstatine A inhibe l'enzyme qu'à 13.7% pour une concentration de 0.1Mmol/l et de 48.36% pour une concentration de 0.2 mmol/l, malgré cette inhibition, la pepstatine A n'est pas considérée comme un inhibiteur potentiel, par contre l'activité coagulante est entièrement inhibée à 100% avec l'EDTA à 5 et à 10 Mmol/l, ce qui indique que l'enzyme étudiée appartient au groupe des metalloprotéases, caractérisées par la présence d'ions métalliques divalents sur leur site actif.

Ce groupe inclut les protéases microbiennes principalement les Bacillus: *Bacillus amyloliquefaciens* D4 (**He et al., 2011**), *Bacillus amyloliquefaciens* JNU002 (**Ding et al., 2012**), *Bacillus subtilis* YB-3 (**Li et al., 2012**), *Paenibacillus* spp.BD3526 (**Hang et al., 2016**) et *Bacillus mojavensis* P47M (**Kahlouche et Nouani, 2017**).

En effet, **Bey et al. (2018)** ont montré que les protéases contenues dans les extraits bruts de fenouil étaient sensibles à l'inhibition par PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride), ce qui indique qu'il peut s'agir d'une protéase sérine. Puisque il y avait une augmentation des activités en présence d'un agent séquestrant des métaux, cela pourrait indiquer la présence de certaines protéases métal / ion pouvant interférer négativement avec l'activité de coagulation du lait (**Merheb-Dini et al., 2010**). **Corrons et al. (2012)** ont signalé la présence de protéases sérine ayant des activités caséinolytiques et de coagulation du lait dans le latex de *Maclura pomifera*.

3. Analyse statistique

Ce modèle statistique utilisant la méthode de régression linéaire multiple est utilisée pour étudier l'effet de chaque paramètre (température (T), pH, CaCl₂, concentration de l'extrait enzymatique (CEE)) sur l'activité coagulante de l'EEB. L'objectif principal est de maximiser l'activité de coagulation. L'expérience a été effectuée 38 fois avec 3 répétitions pour chaque analyse (114 analyses au total), tout en variant soit : la température, pH, CaCl₂, CEE et en fixant les trois autres paramètres (**tableau n°32**). L'activité coagulante est donnée sous cette forme : moyenne ± écart type pour chaque essai.

Avant de procéder à l'interprétation des résultats statistiques, il faut vérifier trois conditions concernant le model de régression linéaire multiple à savoir :

- **La significativité du modèle:** vérifier si les variables indépendantes (T°C, pH, CaCl₂, CEE) sont associées significativement à la variable dépendante (AC). Elle est déterminée par le test de Fisher (p-value < 0.05) ou par le coefficient d'ajustement R².

Tableau n°32: Saisie des données statistiques sur le logiciel SPSS.

N° ordre	pH	T	CaCl ₂	CEE	AC(UP)
1	5,70	35,00	10,00	76,70	,68 ± 0.01
2	5,90	35,00	10,00	76,70	,66 ± 0.01
3	6,10	35,00	10,00	76,70	,54 ± 0.00
4	6,30	35,00	10,00	76,70	,53 ± 0.00
5	6,50	35,00	10,00	76,70	,53 ± 0.01
6	6,70	35,00	10,00	76,70	,48 ± 0.01
7	6,90	35,00	10,00	76,70	,47 ± 0.01
8	7,10	35,00	10,00	76,70	,39 ± 0.03
9	7,30	35,00	10,00	76,70	,33 ± 0.02
10	7,50	35,00	10,00	76,70	,30 ± 0.00
11	7,70	35,00	10,00	76,70	,26 ± 0.00
12	7,90	35,00	10,00	76,70	,13 ± 0.00
13	8,00	35,00	10,00	76,70	,00 ± 0.00
14	6,40	35,00	10,00	76,70	,49 ± 0.01
15	6,40	35,00	20,00	76,70	,51 ± 0.01
16	6,40	35,00	30,00	76,70	,53 ± 0.00
17	6,40	35,00	40,00	76,70	,55 ± 0.00
18	6,40	35,00	50,00	76,70	,53 ± 0.00
19	6,40	35,00	60,00	76,70	,51 ± 0.01
20	6,40	35,00	70,00	76,70	,40 ± 0.00
21	6,40	35,00	80,00	76,70	,39 ± 0.00
22	6,40	35,00	10,00	15,30	,12 ± 0.01
23	6,40	35,00	10,00	30,70	,12 ± 0.04
24	6,40	35,00	10,00	38,70	,13 ± 0.03
25	6,40	35,00	10,00	61,40	,33 ± 0.08
26	6,40	35,00	10,00	76,70	,48 ± 0.01
27	6,40	30,00	10,00	76,70	,33 ± 0.03
28	6,40	35,00	10,00	76,70	,49 ± 0.00
29	6,40	40,00	10,00	76,70	,51 ± 0.01
30	6,40	45,00	10,00	76,70	,51 ± 0.07

31	6,40	50,00	10,00	76,70	,51 ±0.09
32	6,40	55,00	10,00	76,70	,69 ±0.02
33	6,40	60,00	10,00	76,70	1,23±0.06
34	6,40	65,00	10,00	76,70	1,57±0.06
35	6,40	70,00	10,00	76,70	1,72±0.21
36	6,40	75,00	10,00	76,70	2,04±0.36
37	6,40	80,00	10,00	76,70	1,63±0.09
38	6,40	85,00	10,00	76,70	,00 ±0.00

- **Aucune multi-colinéarité parfaite** : il ne doit pas y avoir de relation linéaire parfaite entre deux ou plusieurs variables indépendantes. Par conséquent, les corrélations ne doivent pas être trop fortes entre celles-ci. Cette prémisse peut être vérifiée avec le VIF (Variance Inflation Factor), ce dernier doit être <10 pour chaque variable indépendante.
- **Indépendance des erreurs** : les erreurs ne doivent pas être corrélées, cette prémisse peut être vérifiée avec la statistique Durbin-Watson, pour que le modèle soit significatif il faut que : $1 < DW < 3$.

Après la saisie de ces données statistiques sur le logiciel SPSS, il apparaît que ces conditions sont vérifiées (**tableau n°33**).

Tableau n°33: Conditions d'utilisation de la régression linéaire multiple.

La significativité du modèle			La multicollinéarité		Indépendance des erreurs
Test de Fisher	p-value	R ²		vif	
26.67	0.000<0.05	0.495	pH	1.101	Durbin-Watson 1.008
			T	1.149	
			CaCl ₂	1.127	
			CEE	1.089	

🚩 Evaluation des paramètres du modèle

Le test-F de Fisher démontre une significativité dans le modèle de régression où la p-value inférieure à 0.05 et le coefficient de détermination R² était de 0.495. Le R² statistique indique que le modèle établi explique 49.5 % de la variabilité de l'activité de coagulation du lait.

Le modèle utilisé étant significatif, il est possible de construire l'équation de régression pour prédire une valeur de Y (AC). L'équation de base est la suivante :

$$AC : (b_0 + b_1T + b_2pH + b_3CaCl_2 + b_4CEE) + \epsilon_i$$

Remplaçons maintenant les b par les coefficients fournis dans le **tableau n°34**.

➤ **L'équation du modèle est :**

$$AC = 0.828 + 0.022 T - 0.256 pH - 0.001 CaCl_2 + 0.008 CEE$$

Ces coefficients renseignent sur la significativité et le degré auquel chaque prédicteur influence l'activité coagulante. D'après les résultats obtenus (**tableau n°34**), on constate que tous les paramètres étudiés la température (T), concentration en extrait enzymatique (CEE), le pH contribuent d'une façon significative au modèle sauf la concentration en $CaCl_2$ qui n'a pas d'effet significatif sur l'activité coagulante. Plus la valeur de test de student (t) est élevée plus la p-value est petite, plus le prédicteur contribue au modèle, ce qui montre que la température exerce un effet trop significatif par rapport à la CEE et au pH avec $t=7.849$ et une p-value de $0.000 < 0.05$.

Tableau n°34: Evaluation des paramètres du modèle.

Modèle	Coefficients non standardisés		t	p-value
	A	Erreur standard		
(Constante)	,828	,571	1,451	,150
T	,022	,003	7,849	,000
pH	-,256	,080	-3,198	,002
CaCl₂	-,001	,002	-,660	,511
CEE	,008	,003	2,693	,008

🔧 **Obtention du modèle mathématique parfait**

Grâce au test de Student, les coefficients de régression non significatifs sont éliminés ($CaCl_2$). Les coefficients significatifs sont utilisés afin de construire un modèle mathématique parfait qui nous permet de déterminer, en fonction des valeurs des variables utilisées, l'activité coagulante correspondante. Ce modèle mathématique est donné par l'équation suivante :

$$AC = 0.735 + 0.023 T - 0.245 pH + 0.007 CEE$$

L'analyse des coefficients de régression des facteurs montre que la température et la CEE exercent un effet positif respectivement 0.023 et 0.007, alors que le pH exerce un effet négatif - 0.245.

En conclusion, en augmentant la température et la CEE et en diminuant le pH, l'activité coagulante sera meilleure.

Activité coagulante maximale

L'activité coagulante maximale prédite par l'équation mathématique du model parfait est de **355.55 US** correspondant aux paramètres optimaux suivants : T= **75°C**, pH =**5.7** et CEE =**76.70 mg/ml**. Alors que dans les conditions expérimentales, cette valeur est légèrement élevée et est égale à **388.88 US**. La valeur déterminée expérimentalement est en corrélation avec celle déterminée par le logiciel ce qui confirme l'adéquation de notre modèle. De ce fait *Bacillus velezensis* produit une protéase coagulant le lait avec une activité coagulante de **388,88 US** sous les conditions optimales choisies.

III- Purification de l'extrait enzymatique brut

1. Précipitation au sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium permet de fractionner et de précipiter les protéines contenues dans l'extrait brut. Un gradient de précipitation a été utilisé au cours de la précipitation dans l'intervalle de concentration 40%, 60%, 80%.

A chaque centrifugation à 10000trs/mn pendant 30 mn à 4°C, l'activité coagulante du culot et du surnageant est mesurée selon la méthode de Berridge (**tableau n°35**).

Ainsi nous avons constaté d'après les valeurs indiquées dans le **tableau n°35** une précipitation totale à partir du taux de saturation de 80% de $(\text{Na}_4)_2\text{SO}_4$.

Nos résultats concordent avec ceux de **Khan et al. (1983)** et **Yang et al. (1987)** qui ont obtenu une précipitation totale des protéines enzymatiques à 80% de saturation en sulfate d'ammonium.

Tableau n°35: Précipitation de l'extrait enzymatique brut au sulfate d'ammonium.

Saturation en $(\text{Na}_4)_2\text{SO}_4\%$	Activité coagulante dans le surnageant (US)	Activité coagulante dans le culot (US)
40	22.88	13.33
60	19.77	24.44
80	-	28.44

2. Purification de l'EEB par gel filtration

Les protéines enzymatiques sont séparées selon leurs poids moléculaire à travers le gel Séphadex G-75 dont la zone de fractionnement est comprise entre 3000 et 70000 Da. L'élution est réalisée avec la solution tampon acétate de sodium à 0.1 M, pH = 5,5.

Le volume de l'extrait brut injecté est de 1.5 ml, les éluats de la colonne sont recueillis dans le collecteur de fraction à raison de 2.2 ml/tube, on détermine par la suite la densité optique à 280 nm et l'activité coagulante de chaque fraction.

Le profil chromatographique de l'extrait coagulant brut sur gel filtration G 75, montre 3 pics d'absorption bien distincts (**figure n°61**), dont les tests de coagulation ont confirmés que le 1^{er} pic est inactif alors que le 2^{ème} et le 3^{ème} sont actifs, qui correspond à la 10^{ème} jusqu'à la 18^{ème} fraction soit un volume total d'élution de 17.6 ml. Les autres fractions représentent des protéines non-actives issues probablement du milieu de fermentation, mais le pic le plus actif étant le second pic alors que le 3^{ème} pic est moins actif que le précédent avec une activité coagulante relative faible. Des profils similaires sont rapportés par **Ding et al. (2011)** à partir des extraits issus de *Bacillus velezensis*.

La force coagulante de cette fraction est de l'ordre de 16.45 US et sa teneur en protéines est de 76.6 mg/ml. Cependant, ce niveau de purification n'est que partielle, car il y'a d'autres protéines de masses moléculaires très rapprochées qui peuvent être incluses dans cette même fraction.

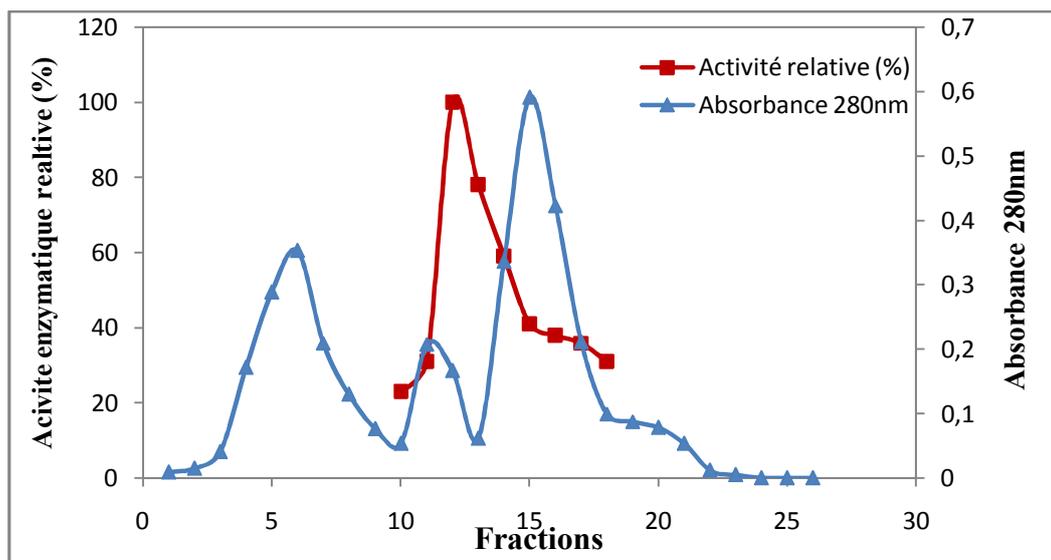


Figure n°61: Profil d'élution sur Séphadex G-75 de l'extrait enzymatique brut de *Bacillus velezensis* FK6A. (Colonne 1,5 × 30 cm, Tampon d'élution Acétate (0,01 M, pH 5,5), débit : 36 ml/h, fraction de 2,2 ml).

3. Paramètres de purification

Afin de pouvoir quantifier les impacts des différentes étapes de purification sur les teneurs en protéine enzymatiques, les paramètres de purification ont été déterminés (**tableau n°36**). La diminution de la teneur en protéines lors des différentes étapes de séparation et l'augmentation de l'activité spécifique montre qu'il y'a eu purification.

Tableau n°36: Paramètres de purification de l'extrait coagulant de *Bacillus velezensis* FK6A.

Etape de purification	Protéine (mg/ml)	Activité coagulante (US)	Activité spécifique (US/mg protéine enzymatique)	Facteur de purification	Rendement %
EEB	76.6	122.05	1.59	1	100
Précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ %	2.34	30.76	13.14	8.26	25.20
Filtration sur gel	0.268	16.45	61.38	38.60	13.48

- **Activité spécifique :** représente le rapport de la force coagulante par la concentration en protéines US/mg de protéine enzymatique, plus l'activité spécifique est élevée, plus la protéine est pure.

L'activité spécifique de notre extrait enzymatique après purification est de l'ordre de 61.38 US/mg, elle est supérieure à celle de l'extrait brut qui est de 1.59US/mg; cette valeur marque l'efficacité de la purification.

- **Rendement en activité % :** représente le rapport de la force coagulante après l'étape de la purification et celle de l'extrait brut.

L'étape de purification par précipitation au sulfate d'ammonium permet d'avoir un rendement de 25.2%. En revanche, l'étape de purification sur gel G-75 présente un rendement d'activité de 13.48 %. Ce rendement il est faible par rapport à celui de l'extrait brut, cette différence observée pourrait être liée à la concentration des protéines enzymatiques dans l'extrait brut.

- **Facteur de purification :** représente le rapport entre l'activité spécifique après la purification et celle de l'extrait brut.

L'étape de purification sur gel de filtration a permis de concentrer l'enzyme coagulante environ 38 fois, comparée à l'extrait brut.

4. Estimation du poids moléculaire

Il est bien établi que la chromatographie de gel filtration est une technique adéquate pour l'estimation de la masse moléculaire des protéines. Ainsi, nos résultats (**Figure n°62** et **tableau n°37**) rapportent que le poids moléculaire évalué par chromatographie d'exclusion moléculaire est d'environ 46 kDa.

Tableau n°37: Estimation du poids moléculaire de la fraction active de *Bacillus velezensis* FK6A.

Marqueurs protéiques	PM (kDa)	Log PM	Volume d'éluion (ml)
BSA	67	2,19	15,6
Ovalbumine	40	1,6	32,2
Anhydrase carbonique	30	1,47	39,6
Trypsine	20	1,37	44
<i>Bacillus velezensis</i>	46	1,66	26,4

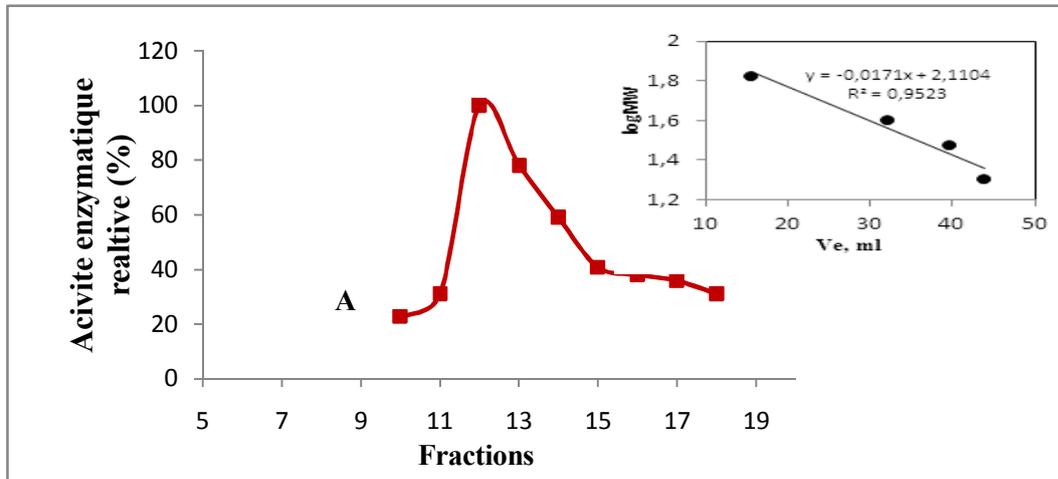


Figure n°62: Poids moléculaire de la fraction active de *Bacillus velezensis* obtenu à partir du profil de gel filtration sur Séphadex G-75(A). 1 : BSA, 1; Bovin sérum albumine (67 KDa), 2:Ovalbumine (40kDa), 3: anhydrase Carbonique (30kDa), 4:trypsine (23.8k Da) (B).

- Équation de la droite de régression : $PM = f(Ve) \quad y = -0,0171x + 2,1104$
 $R^2 = 0,9597$

En utilisant le même protocole, **Kumari et al. (2016)** trouve une masse de 27 kDa avec *Bacillus subtilis* MTCC 10422.

En effet, cette masse semble plus élevée que les protéases coagulant le lait issues du genre *Bacillus* et contredisent les résultats rapportés par certains auteurs (**tableau n°38**).

Tableau n°38: poids moléculaire de quelques protéases du genre *Bacillus*.

Microorganisme	PM (kDa)	Références
<i>Bacillus pumilus</i> UN-31-C-42	32	Huang <i>et al.</i> (2003)
<i>Bacillus pseudofirmus</i> AL-89	24	Gessesse <i>et al.</i> (2003)
<i>Bacillus subtilis</i> PE-11	15	Adinarayana <i>et al.</i> (2003)
<i>Bacillus megaterium</i>	27	Yossan <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus patagoniensis</i> PAT05	29.4	Olivera <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus proteolyticus</i> CFR3001	29	Bhaskar <i>et al.</i> (2007)
<i>Bacillus circulans</i> BM15	39.5	Venugopal and Saramma (2007)
<i>Bacillus subtilis</i> SAL 1	27	Almas <i>et al.</i> (2009)
<i>Bacillus firmus</i> Tap5	34	Joshi (2009)
<i>Bacillus licheniformis</i> MP1	30	Jellouli <i>et al.</i> (2011)
<i>Bacillus mojavensis</i> P47M	31	Kahlouche et Nouani (2017)

Toutefois, l'emploi d'une électrophorèse de notre extrait purifié devient nécessaire pour déterminer la forme monomère ou dimère de notre enzyme afin de justifier la valeur jugée élevée du PM trouvé.

IV- Essai de fabrication d'un fromage à pâte pressée cuite

Afin d'évaluer la qualité des fromages obtenus avec l'EEB, comparée à celle des fromages obtenus avec la présure et le mélange (EEB+présure), nous avons déterminé leur caractéristiques physicochimiques et organoleptiques.

Tableau n°39: Composition physico-chimique du lait utilisé dans la fabrication fromagère.

Propriétés physico-chimiques	Acidité (°D)	pH	Densité à 20°C	MG (%)	EST (%)	ESD (%)
Valeurs obtenus	16.7	6,6	1,031	3,6	12,3	8.7
Normes J.O	15-17	6,5-6,8	1,028-1,033	3,4-3,6	10,2-12,5	87,5-89,9

Les résultats de la composition du lait utilisé pour la réalisation de notre essai, indique un profil physicochimique qui concorde avec les normes de référence ainsi que de celui du lait de vache décrit par la littérature (**Vignola, 2002 ; Fredot, 2005**).

1. Analyses physico-chimiques du fromage élaboré type pâte pressée cuite

Nous avons élaboré 3 types de fromages à pâte pressée cuite référenciés comme suit :

E1 : fromage élaboré à partir de EEB ;

E2 : fromage élaboré à partir de la présure ;

E3 : fromage élaboré à partir du mélange EEB+ présure (50/50).

La composition physicochimique des trois fromages élaborés est indiquée dans le **tableau n°40**.

Tableau n°40: Composition physicochimiques globale des fromages obtenus avant affinage.

Propriétés physico-chimiques	pH	Acidité	MG g/l	EST g/l	MG/EST (%)	ESD g/l	Rdt (%)
E1	4.75	15,5	22	47.83	45.99	25.83	41.50
E2	5.01	15	23	49.78	46.20	26.78	42.17
E3	4.90	14	21.6	47.25	45,71	25.65	40.78

Les résultats indiquent que l'emploi de l'EEB donne un fromage (E1) ayant une acidité et une teneur en matière grasse comparables à celles des deux autres fromages obtenus (E2 et E3) respectivement avec la présure et le mélange présure + EEB.

Le rapport Matière Grasse/ Extrait sec total, caractéristique importante des fromages. Il permet d'apprécier d'une façon précise la teneur en matière grasse dans 100g d'extrait sec total (**Veisseyre, 1975**). Nous remarquons que ce rapport est comparable pour les deux fromages obtenus avec l'EEB et le mélange (EEB+ présure), mais demeure relativement faible par rapport au fromage obtenu avec la présure.

2. Rendement fromager

Le rendement fromager présente un grand intérêt en industrie fromagère car il reflète globalement la répartition quantitative des constituants du lait lors de l'égouttage. Il permet donc de juger pour un type de fromage donné si la fabrication a été menée dans de bonnes conditions.

Les résultats relatifs au rendement fromager de chaque fromage élaboré sont indiqués par le **tableau n°40** qui montre qu'il n'y a pas de différence significative (en rendement) entre les

trois types de fromages. On remarque également que malgré la forte activité protéolytique dont est dotée l'extrait enzymatique brut de *Bacillus velezensis*, les pertes en rendement sont faibles (**figure n°63**), cela est probablement dû à l'effet du traitement thermique exercé sur le caillé au cours de la cuisson qui a inactivé l'activité protéolytique de l'enzyme.

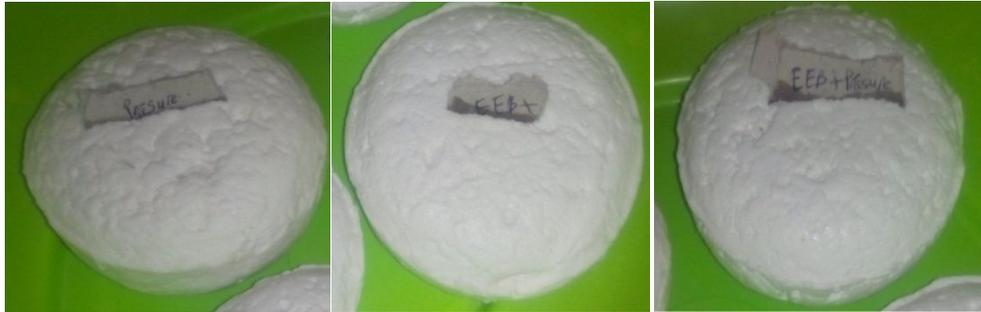


Figure n°63: Aspect final des trois fromages élaborés par les différents extraits coagulants.

3. Analyse sensorielle du fromage

Les caractéristiques organoleptiques ont été évaluées à l'aide du Quick Rank Test de KRAMER (**Kramer, 1960**). Cette méthode est appréciée par le calcul de la moyenne des scores (notes attribuées par les 10 panélistes pour chaque lot) et la somme des rangs (classement selon le score des différents lots). La différence entre les différents lots (les trois fromages) est jugée non significative dans l'intervalle de rang total compris entre 14 et 22, au seuil de probabilité de 5%. Les résultats de l'analyse sensorielle portant sur les critères (**Annexe I.6**): couleur, texture et goût des fromages à pâtes pressées cuites préparés avec l'EEB, l'extrait de mélange (EEB+Présure) ainsi que la présure commerciale sont représentés sous forme de tableau récapitulatif (**tableau n°41**) et d'histogrammes (**figures n°64, n°65, n°66**).

Tableau n°41: Tableau récapitulatif des résultats de test de dégustations obtenus sur les fromages élaborés.

Caractère	Goût		Couleur		Texture	
	MS	SR	MS	SR	MS	SR
Fromage						
EEB	2.4	27	3.1	29	3.7	26.5
Mélange (EEB + présure)	3.8	17.5	4.45	17.5	4.2	18.5
Présure	4	15.5	4.7	13.5	4.55	15

MS : Moyenne des scores ; SR : Somme des rangs.

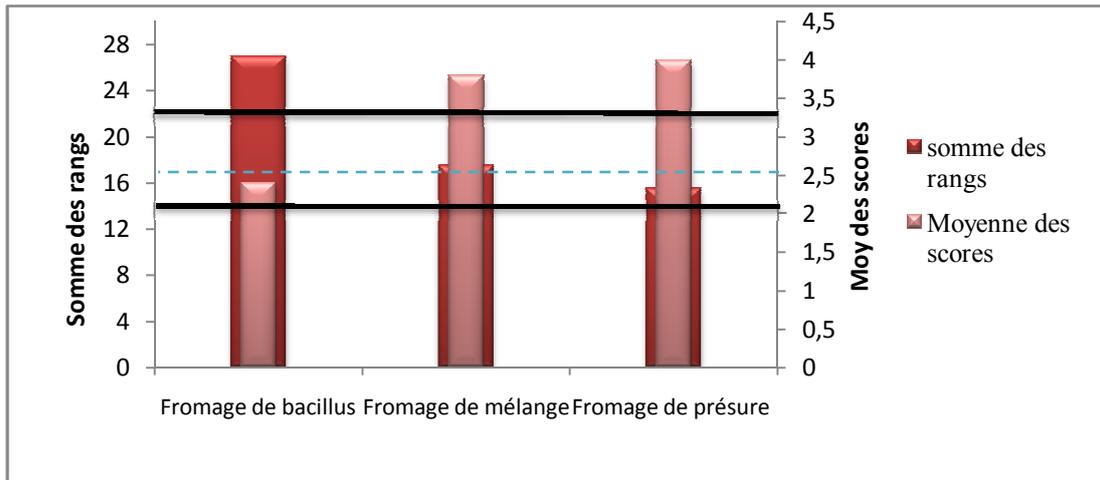


Figure n°64: Histogramme des résultats des analyses du **goût** des fromages fabriqués. La différence observée est non significative dans l'intervalle 14-22 (zone entre les traits pleins).

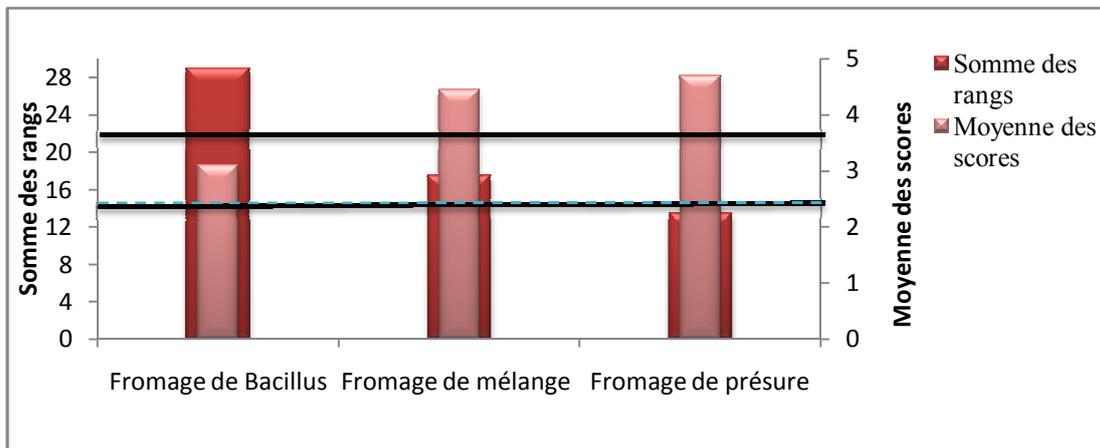


Figure n°65: Histogramme des résultats des analyses de **la couleur** des fromages fabriqués.

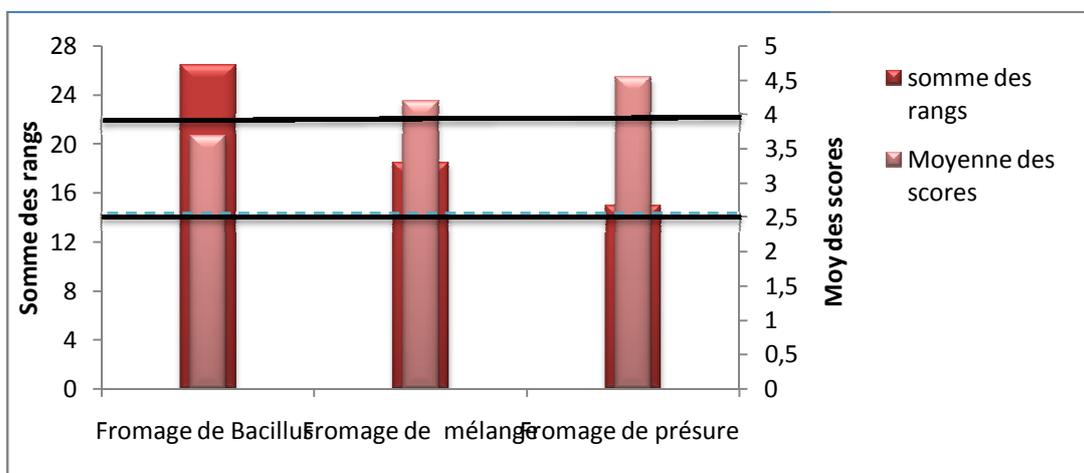


Figure n°66: Histogramme des résultats des analyses de **la texture** des fromages fabriqués.

➤ **Interprétation des résultats de l'analyse sensorielle**

✓ **Goût**

La somme des rangs des deux fromages faits par présure et le mélange (présure + EEB) figure dans l'intervalle d'acceptabilité 14-22, cela signifie qu'il n'y a pas de différence significative en goût entre les deux fromages. Cependant, le fromage EEB est considéré statistiquement mauvais car la somme des rangs dépasse la limite supérieure d'acceptabilité (22). Par ailleurs, la moyenne des scores (3.5) attribuée à ce dernier, permet de constater que son goût est apprécié par l'ensemble des panélistes.

✓ **Couleur**

Selon la somme des rangs (SR), le fromage mélange se situe dans l'intervalle de signification [14-22]. Le fromage présure qui se situe au dessous de la limite inférieure de signification est statistiquement meilleur que les lots fabriqués à base d'EEB et de mélange (présure + EEB).

Or, Le fromage EEB, présente une somme des rangs (SR) supérieure à la limite acceptable, il est donc significativement mauvais.

Selon la moyenne des scores (MS), la couleur du fromage présure est la mieux appréciée par les panélistes avec un score égale à 4.5. Cependant, le fromage EEB présente la note la plus faible. Par ailleurs, les scores de l'ensemble des lots attribués par les panélistes à ce dernier, sont supérieurs à la limite acceptable(2,5).

✓ **Texture**

Sur le plan texture et selon la somme des rangs (SR), aucune différence significative n'est observée entre les deux fromages faits à base présure et du mélange (EEB + présure) au seuil de probabilité de 5%. Par ailleurs, le fromage EEB est statistiquement mauvais. Toutefois, les moyennes des scores relevés pour les trois fromages se rapprochent les unes des autres et sont supérieures à limite acceptable.

Conclusion

En conclusion, cette étude nous a permis d'atteindre un objectif principal est de contribuer à une meilleure connaissance de la protéine coagulant le lait en tant que succédanée de présure, dérivée de la culture d'une souche bactérienne *B. velezensis* FK6A. Cette souche connue pour être productrice d'enzymes protéolytiques n'a pas fait l'objet d'un travail portant sur ses aptitudes à coaguler le lait à travers la littérature examinée. Aussi, nous nous sommes

intéressés à ce volet en donnant plus de rigueur à la méthodologie appliquée et de montrer à travers les résultats obtenus l'originalité de la thématique de notre sujet.

Le profil chromatographique de l'extrait coagulant brut sur gel filtration G-75, montre 3 pics d'absorption bien distincts dont le pic le plus actif étant le second pic avec une force coagulante de l'ordre de 16.45 US. Ainsi, nos résultats rapportent que le poids moléculaire évalué par chromatographie d'exclusion moléculaire est d'environ 46 kDa.

L'étude de l'effet des inhibiteurs montre que notre extrait enzymatique appartient au groupe des metalloprotéases, caractérisées par la présence d'ions métalliques divalents sur leur site actif.

Par ailleurs, lors des essais de méthodologie, l'activité très protéolytique des extraits de *Bacillus velezensis* observés sur les caillés se manifeste quelques minutes après l'apparition d'un coagulum ferme qui se traduit ensuite par l'apparition d'un sérum abondant. En effet, pour résoudre ce problème nous avons orienté la fabrication vers un fromage de type pressé à pâte cuite.

Les résultats obtenus après la comparaison entre les différents types de fromages ont abouti aux conclusions suivantes :

- Les résultats du rendement fromager de chaque fromage élaboré montrent qu'ils sont comparables et qu'il n'y a pas de différence significative entre eux.
- L'évaluation sensorielle des trois fromages a révélé une texture et couleur satisfaisante pour chaque fromage. Cependant, le goût du fromage fait à partir de l'EEB est moins apprécié en comparaison avec les deux autres fromages, probablement du au milieu de fermentation qui a affecté la qualité du produit élaboré.

L'ensemble des résultats auxquels a abouti notre étude montrent que la protéase étudiée présente des potentialités coagulantes non négligeables et ouvrent de nouvelles pistes de recherche.

Références bibliographiques

Abdelfattah A.F., El-hawwary N.M., 1974. Studies on the production of milk clotting enzymes, proteolytic enzymes and mucilage by fungi. *Journal of Gen. Microbiology*, 84, p.p.327–331.

A.F.N.O.R., 1993. Recueil de normes françaises. Contrôle de la qualité de produits alimentaires: Laits et produits laitiers. Analyses physicochimiques. (4^{ème} ed.). Paris, 562p.

- Ahmed S.A., Helmy W. A., 2012.** Comparative evaluation of *Bacillus licheniformis* 5A5 and *Aloe variegata* milk-clotting enzymes. *Journal of Chemical Engineering.*, 29 (1), p.p.69-76.
- Ahmed S. A., Wehaidy H. R., Ibrahim O. A., Abd El Ghani S., El-Hofi M. A., 2016.** Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, p.p.241–249.
- Arima K., Yu J., Iwasaki S., 1970.** Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lin dt. In: Perlmann G, Lorand L, editors. *Methods in Enzymology*, New York, 19, p. 446–59.
- Badgajar S.B., Mahajan R.T., 2014.** Nivulian-II a new milk clotting cysteine protease of *Euphorbia nivulia* latex, *International Journal of Biology and Macromolecular*, (70) p.p. 391–398.
- Bey N., Debbebi H., Abidi F., Marzouki M. N., Ben Salah A., 2018.** The non-edible parts of fennel (*Foeniculum vulgare*) as a new milk-clotting protease source. *Industrial Crops and Products*, 112, p.p.181–187.
- Collin J. C., Grappin R., Legraet Y., 1977.** Etude de la méthode de mesure, selon Berridge, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. *Lait.Franc*, 355, p.p.389-394.
- Corrons M.A., Bertucci J.I., Liggieri C.S., López L.M.I., Bruno M.A., 2012.** Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. *Food Science and Technology*, 47, p.p.103-109.
- Ding Z., Liu S., Gu Z., Zhang L., Zhang K., Shi G., 2011.** Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran. *African Journal of Biotechnology*, 10 (46), p.p.9370-9378.
- Ding Z., Wang W., Wang B., Ouyang A., Xiao S., Wang Y., Liu S., Ding M., Zhang L., Shi G., 2012.** Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran. *Food Research and Technology*, 234, p.p. 415-421.
- Esteves C.L.C., Lucey J.A., Wang T., Pires E.M.V., 2003.** Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *Journal of Dairy Science*, 86, p.p.2558–2567
- Fredot E., 2005.** *Connaissance des aliments : Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique.* Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 424 p.
- Glantz M., Mansson H. L., Stalhammar H., Paulsson M., 2011.** Effect of polymorphisms in the leptin, leptin receptor, and acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) genes and genetic polymorphism of milk proteins on cheese characteristics. *Journal of dairy science*, 94 (7), p.p.3295-3304.
- Hang F., Wang Q., Hong Q., Liu P., Wu Z., Liu Z., Hao Z., Chen W., 2016.** Purification and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase from *Paenibacillus* spp. BD3526. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, p.p.547–554.
- Harbutt, 2010.** *Le grand livre des fromages.* Milan, Toulouse, France, 354p.
- He X., Ren Z., Guo H., Zhang W., Song X., Gan B., 2011.** Purification and properties of a milk clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28(1), p.p.203-208.

Jacob M., Jaros D., & Rohm H., 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, **64**, p.p.14–33.

Kamoun P., 1977. Appareils et méthodes en biochimie. 3ème ed flammarian ; Paris.

Kahlouche A., Nouani A., 2017. Characterization of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus mojavensis* P47M strain isolated from Algerian dairy farm soil. *Research Journal of Biotechnology*, **12** (12), p.p.37-45.

Khan M.R, Blain J.A., Brown J., Patterson J.D.E., 1983. Partial purification of intracellular proteases. *Applied and environmental microbiology*, **1(45)**, p.p.94-96.

Kramer A., 1960. A quick, rank test for significance of difference in multiple comparisons food technology, **10(8)**, p.p.391-392.

Kumar A., Sharma J., Saharab M.R., Singb R., 2005. Extracellular acid protease2 from *Rhizopus oryzae* : purification and characterization. *Elsevier Process Biochemistry*, **40**, p.p. 1701-1705.

Kumari Narwal R., Bhushan B., Pal A., Panwar A., Malhotra S. 2016. Purification, physico-chemico-kinetic characterization and thermal inactivation thermodynamics of milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422. *LWT - Food Science and Technology*, **65**, p.p.652–660.

Li Y., Liang S., Zhi D., Chen P., Su F., Li H., 2012. Purification and characterization of *Bacillus subtilis* milk-clotting enzyme from Tibet Plateau and its potential use in yak dairy industry. *Food Research and Technology*, **234**, p.p.733-741.

Lowry O.M., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, **193**, p.p.265-275.

Mahaut M., Jeantet R., Brulée G., 2000. Initiation à la technologie fromagère. Tec et Doc/ Lavoisier, Paris, 200 p.

Merheb-Dini C., Gomes E., Boscolo M., Da Silva R., 2010. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Food Chemistry*, **120**, p.p.87-93.

Nouani A., Belhamiche N., Slamani R., Belbraouet S., Fazouane F. and Bellal M.M., 2009. Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization, *International Journal of Dairy Technology*, **62**, 112 p.

Pant G., Prakash A., Pavani J. V. P., Bera S., Deviram G. V. N. S., Kumar A., Prasuna R. G., 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, **9(1)**, p.p.50–55.

Patel A. R., Mokashe N. U., Chaudhari D. S., Jadhav A. G., Patil U. K., 2019. Production optimisation and characterisation of extracellular protease secreted by newly isolated *Bacillus subtilis* AU-2 strain obtained from *Tribolium castaneum gut*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.

Payens T.A.J., Wiersma A.K., Brinkhuis J., 1977. On enzymatic clotting processes I. kinetics of enzyme-triggered coagulation reactions. *Biophys. Chem.* **6**, p.p.253–261.

Poza M., Sieiro C., Carreira L., Baross-Velazquez J., Villa T.G., 2003. Production and Characterization of the Milk-Clotting Protease of *Myxococcus Xanthus* Strain 422, *Indian Journal of Biotechnology*, **30**, p.p. 691-698.

Puhan Z., Irvine D. M., 1973. Proteolysis by proteases of *Bacillus subtilis* used to make Canadian Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **56 (3)**, p.p.317-322.

Rao K., Mathur D. K., 1976. Studies on the production of bacterial rennet in pilot plant fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, **17**, p.p.1349-1351.

Raposo S.A, Domingos A., 2008. Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process Biochemistry*, **43**, p.p. 139-144.

Shieh C.J., Phan Thi, L.A., Shih, I.L. 2009. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. *Biochemical Engineering Journal*, **43(1)**, p.p. 85-91.

Talantikite-Kellil S., Nouani, A., Saunier, M., Gillmann, L., Brahmi, A and Fazouane, 2012. Isolation and identification of bacterial strain I33M producing milk-clotting enzyme: Optimization of culture parameters using response surface. *African Journal of Biotechnology*. **11(100)**, p.p.16594-16606.

Talantikite K. S., 2015. Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie. Thèse de doctorat, technologie alimentaire, Université M'hamed Bouguara Boumerdès, 167p.

Tsouli J., 1979. Etude d'une protéase coagulante extraite de *Cynara scolymus* et de *Cynara cardunculus*, adaptation de la méthode conductimétrique pour la détermination du temps de coagulation du lait et le contrôle de fabrications. Thèse Doctorat, Univ. C. Bernard, Lyon, p.p.1-62.

Van Hooydonk A.C.M., Walstra P., 1987. Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk. *Netherlands Milk Dairy Journal*. **41**, p.p.19-47.

Vandewegh J., 1997. Le fromage : Le rendement en fromage, Prédétermination et mesure. 2^{ème} édition, Tec Et Doc, Lavoisier, Paris, 875p.

Veisseyre R., 1975. Technologie du lait. 3^{ème} édition. La Maison Rustique, Paris, 713p.

Vignola, 2002. Science et technologie du lait: transformation du lait. Presses inter Polytechnique. Montréal (Québec), 576 p.

Yang W.P., Kobayashi H., Kusakabe I., 1987. Purification and characterization of soymilk-clotting enzyme from *Bacillus* sp k2956-7. *Agri.Bio.Chem*, **9(51)**, p.p.2343-2349.

Zhang Y., Xia Y., Ding Z., H. Lai P. F., Wang G., Xiong Z., Ai L. , 2019. Purification and characteristics of a new milk-clotting enzyme from *Bacillus licheniformis* BL312. *LWT*, **113**, p.p.108-276.

Cette étude nous a permis de caractériser trois protéases d'origine végétale (*Cynara scolymus*) et microbienne (*Bacillus velezensis*, *Mucor circinelloides* SF15) et les fromages fabriqués à base de ces différentes coagulases sur les plans biochimique, sensorielle et rhéologique. L'objectif était de vérifier leur aptitude à coaguler le lait en vue d'assurer leur utilisation comme substitut de présure.

Quatre volets principaux ont été suivis lors de notre expérimentation, à savoir l'extraction, la purification, la caractérisation et la fabrication de différents échantillons de fromage en utilisant les différents extraits enzymatiques caractérisés.

Dans une première étape, une détermination de l'activité coagulante et protéolytique des extraits coagulants a été effectuée sur des extraits bruts issus des fleurs d'artichauts, de *Mucor* SF15, et *Bacillus velezensis*,

Les résultats obtenus ont montré que les extraits enzymatiques bruts (EEB) fongique et végétal présentent des activités coagulantes plus importantes que celle observée pour l'extrait d'origine bactérienne qui était très protéolytique.

Cependant, le passage des extraits bruts de *Cynara scolymus* et de *Mucor* SF15 à travers une colonne semi-préparative sur gel sephadex G-50 a permis une décoloration totale associée à une purification partielle de ces derniers avec des activités coagulantes de 33 US et 81 US pour l'extrait d'artichaut et celui d'origine fongique respectivement. Par contre, le profil chromatographique de l'extrait coagulant brut de *Bacillus velezensis* sur gel filtration G 75, a révélé une faible force coagulante de l'ordre de 16.45 US.

L'étude des propriétés physicochimiques a pour but de connaître des éventuelles applications des extraits étudiés. Elle a montré qu'il s'agit d'aspartylprotéases pour l'extrait d'artichaut avec un pH optimal de pH 5,2 et une température de 80°C et une métalloprotéase pour l'extrait de *Bacillus velezensis* avec un pH optimal de 5,7 et une température de 75°C.

Le profil électrophorétique montre que les enzymes présentes dans l'extrait sont deux polypeptides qui vraisemblablement deux sous unités de la Cynarase 1 et 2 avec des poids moléculaires respectifs de 36 et 26 kDa.

Les résultats des analyses rhéologiques et sensorielles des différents types de fromages fabriqués à base des trois coagulases ont abouti aux conclusions suivantes :

L'étude rhéologique, menée avec l'extrait enzymatique brut de *Cynara scolymus* a permis de montrer l'évolution du caractère visqueux durant la phase d'emprésurage après formation du gel. Comme cela a été démontré antérieurement, les valeurs élevées du potentiel zêta chez la Cynarase par rapport à la présure explique la fermeté moyennement meilleure chez le

fromage, à base de présure. Ce qui a été confirmé par l'évaluation sensorielle ou les panelistes n'ont observé aucune différence significative entre les deux fromages à pâte pressée non cuite.

En outre, le coupage de l'extrait pré-purifié de *Mucor SF15* avec la présure commerciale a permis également de donner des coagulums appréciables et une pâte à fromage ferme après 4 jours d'affinage. Toutefois, l'étude rhéologique montre que le fromage fabriqué à l'échelle de laboratoire ne manifeste pas réellement un comportement rhéofluidifiant contrairement à la mesure de la viscosité.

Toutefois, les travaux réalisés sur l'extrait de *Bacillus velezensis* ont montré que ce dernier possède des propriétés biochimiques non négligeables par rapport à celles de la présure. Tout en étant plus protéolytique que cette dernière, la protéase de *Bacillus velezensis* conduit à la production de fromage à pâte pressée cuite de bonne qualité et donne un bon rendement fromager sans différence significative par rapport aux fromages coagulés avec de la présure traditionnelle.

Tous ces résultats nous amènent à conclure que les protéases étudiées présentent des potentialités coagulantes non négligeables et ouvrent de nouvelles pistes de recherche.

Il sera donc intéressant de poursuivre ce travail par de nombreuses perspectives à savoir :

- Optimiser les paramètres de production des enzymes à travers une analyse statistique par RSM (Méthodologie de Surface de réponse) ;
- Purifier les enzymes par l'emploi d'une technique complémentaire de gel filtration à savoir la chromatographie échangeuse d'ions.
- Déterminer le poids moléculaire et l'homogénéité protéique des protéases microbiennes par une électrophorèse sur gel polyacrylamide.
- Etudier les paramètres cinétiques de production de l'EEB des enzymes microbiennes en fonction des conditions de fermentation de la culture ;
- Enfin, il serait extrêmement intéressant d'approfondir l'étude de la rhéologie des fromages fabriqués à l'échelle pilote contre des présures de référence qui sont toutes des produits issus de la biodiversité.

Annexe I.1

Préparation de solution tampon (Kamoun, 1977)

La solution tampon acétate de sodium (pH=5.4, 0.1M) est préparée comme suit : (pour 100ml de solution tampon) :

- **Solution A** : acétate de sodium (C₂H₃O₂Na) à 0.1 N (8.204g/l).
- **Solution B** : acide acétique à 0.1 N (6.005g/l).

Mélanger : **67.8ml de A + (100-67.8) de B.**

Annexe I.2

Mode opératoire de dosage du taux de protéine totale par la méthode de Kjeldahl

Etape de minéralisation

L'échantillon (la prise d'essai est de 0,5g d'échantillon (fleurs d'artichaut séchées ou extrait enzymatique brut EEB) est introduit dans le tube de minéralisation (matras de 250ml) puis sont ajoutés, ce qui suit :

- Une pinc résuée de catalyseur (2/3 K₂SO₄ et 1/3 CuSO₄) afin d'accroître la vitesse de conversion des matières azotés en sulfate d'ammonium) ;
- 15ml d'acide sulfurique très concentré (95%-98%)

Après avoir homogénéisé le contenu du matras, positionner le collecteur de fumées sur les matras. Les matras sont ensuite transférés sur le minéralisateur préchauffé à 420°C La minéralisation dure 1h05mn, le minéralisât doit être limpide et exempt de matière non digérée. Après le refroidissement (15 à 20mn), le tube de minéralisation est placé sur le support du distillateur. NB : le blanc doit être fait dans les conditions que les échantillons à analyser, avec 0,85g de saccharose, deux comprimés kjeltabs, 5ml d'eau distillée et 15ml d'acide sulfurique.



Etape de Distillation

Le contenu du matras est dilué avec 80ml d'eau distillée, puis alcaliniser avec 70 ml de soude à 40%. Le distillat est récupéré dans un Erlen Meyer de 250ml, contenant 50 ml d'acide borique (H₃B₃O₃ à 4%) destiné à fixer l'ammoniac.



Titration acido-basique

L'ammoniac piégé par l'acide borique contenu dans l'eren Meyer est titrée par un acide (HCl à 0,1N). L'ammoniaque augmente le pH de la solution et la quantité d'HCl rajoutée pour revenir au pH initial, détectée par l'utilisation d'un indicateur coloré (la couleur vire du bleu au rose), est proportionnelle à la quantité d'ammoniaque. Le volume de l'acide est noté à 0,5ml près.

Expression des résultats

Le taux d'azote pour nos échantillons est obtenu comme suit :

$$\%N = \frac{(T-B) \cdot N \cdot 0,28014 \cdot 100}{W} \text{ ou}$$

T : Volume titrant (ml) pour l'échantillon ;

B : Volume titrant (ml) pour le blanc ;

N : normalité de l'acide titrant ;

W : masse de l'échantillon en mg ou en g.

Annexe I.3

Dosage des protéines par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

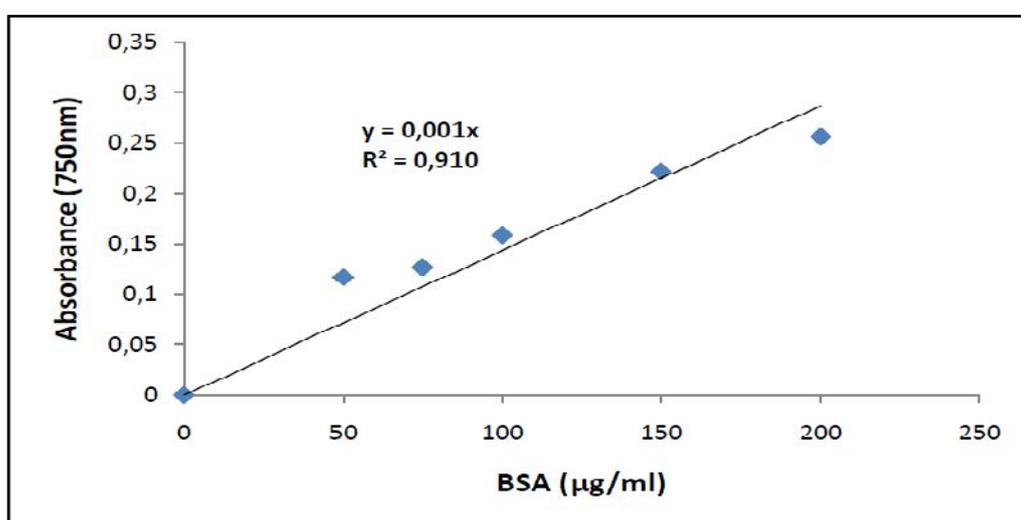
1. Protocole de dosage des protéines

➤ Solutions nécessaires

- Solution A : 5g de Na₂CO₃ dans 100 ml d'eau distillée ;
- Solution B : 0.5g de CuSO₄ et 1g de double tartrate de Na et K dans 100 ml d'eau distillée ;
- Solution C : 50ml de la solution A et 2ml de la solution B (préparation immédiate) ;
- Solution D : 4g de NaOH (0.1N) dans 1000 ml d'eau distillée ;
- Solution E : réactif de Folin-ciocalteau (dilué ½) ;
- Solution F : 20mg de BSA dans 100 ml d'eau distillée.

➤ Dosage

A 1 ml de l'échantillon on ajoute 3 ml de la solution C et 1 ml de la solution D, après un temps de repos de 10mn à température ambiante puis on additionne au mélange 0.5 ml du Folin-Ciocalteau, On agite rapidement et on laisse incuber 30 min à l'obscurité et à température ambiante. La densité optique est mesurée contre un blanc réactif au spectro photomètre à 750nm.



Courbe étalon de la B.S.A

Préparation de substrat de Berridge (COLLIN *et al.*, 1977)

Les constituants du substrat de Berridge

➤ Le lait en poudre

Le lait en poudre utilisé est de type LOW-HEAT obtenu à d'un lait écrémé pasteurisé de bonne qualité bactériologique (moins de 5000 germes/ml).

C'est une poudre n'ayant subi qu'un chauffage faible qui entraîne un respect de l'état physico-chimique de protéines solubles du sérum, elle est réservée dans des boites métalliques dans un endroit non humide.

➤ Solution de CaCl₂

La solution de CaCl₂ de qualité anhydre utilisée à une concentration de 0,01M, la solution est conservée à +4°C à l'obscurité.

Mode opératoire

Pour préparer 100ml de substrat de Berridge, on dissout 12g de lait en poudre dans 100ml de CaCl₂ à 0,01M. On verse une petite quantité de solution sur la totalité de la poudre de façon à obtenir par agitation manuelle une bouillie homogène, le reste de la solution CaCl₂ chlorure de calcium est alors ajoutée sur cette bouillie, puis agité par un agitateur magnétique douce pendant 30mn. Le pH du lait ainsi préparé est ajusté à pH=6,4 avec une solution de HCL 1N ou NaOH 1N. Le substrat est prêt à l'emploi et conserver au réfrigérateur.

Annexe I.4 Electrophorèse en conditions dénaturantes (P.A.G.E.- S.D.S.)

Solutions		Remarques
<i>Solution acrylamide / bis- acrylamide</i>		
Acrylamide	3 g	La solution est dégazée puis filtrée. Elle se conserve à + 4°C
Bis-acrylamide	0,08 g	
Eau distillée	10 ml	
<i>Tampon Tris-HCl 1,5 M ; pH 8,8</i>		
Tris base	18,224 g	Agiter quelques minutes puis filtrer. Garder à température ambiante (flacon brun). Ajuster le pH à 8,8 avec du HCl 4 N
S.D.S.	0,2 g	
Eau distillée	80 ml	
Eau distillée Q.S.P.	100 ml	
<i>Tampon Tris-HCl 0,5 M ; pH 6,8</i>		
Tris base	6,048 g	Agiter quelques minutes puis filtrer. Garder à température ambiante (flacon brun). Ajuster le pH à 6,8 avec du HCl 4 N
S.D.S.	0,4 g	
Eau distillée	80 ml	
Eau distillée Q.S.P.	100 ml	
<i>Tampon échantillon pH 6,8</i>		
Solution (A) : (stock)		Solution à stocker à + 4°C
Tris-HCl 0,5 M ; pH 6,8**	1,65 ml	
E.D.T.A. pH 7,5	120 µl	
Saccharose	4,3 g	
Bleu de Bromophénol	120 µl	
Eau distillée Q.S.P.	20 ml	
Solution (B)		extemporanément

Solution (A)	800 µl	
S.D.S. (10%)	200 µl	
Bleu de Bromophénol	80 µl	
Tampon Tris-HCL 0,5 M ; pH 6,8**		
Tris base	6,048 g	Ajuster le pH à 6,8 avec du HCl 4 N
Eau distillée	80 ml	
Eau distillée Q.S.P.	100 ml	
Tampon de migration pH 8,3 (solution stock 10 fois concentrée)		
Tris base	3,03 g	Ajuster à pH 8,3 avec HCl 4 N
Glycine	14,42 g	
S.D.S.	1 g	
Eau distillée Q.S.P.	100 ml	
Gel de séparation 12 %		
Acrylamide / bis-acrylamide (30 %)	2,75 ml	Le P.S.A. et le T.E.M.E.D. sont ajoutés en derniers. La polymérisation se fait à température ambiante.
Tris base 1,5 M ; pH 8,8	1,25 ml	
Eau distillée	1,3 ml	
P.S.A. (10%)	25 µl	
T.E.M.E.D.	5 µl	
Gel de concentration 5 %		
Acrylamide/bis-acrylamide (30%)	0,375 ml	Le P.S.A. et le T.E.M.E.D. sont ajoutés en derniers. La polymérisation se fait à température ambiante.
Tris base 0,5 M ; pH 6,8	1 ml	
Eau distillée	2,25 ml	
P.S.A. (10%)	40 µl	
T.E.M.E.D.	10 µl	
Solution de fixation		
T.C.A. à 12 %	12 g	
Eau distillée	100 ml	
Solution de coloration au bleu de Coomassie		
Bleu de Coomassie R-250	0,415 g	Agiter, filtrer et conserver à température ambiante.
Méthanol	250 ml	

Acide acétique	50 ml	
Eau distillée	250 ml	
Solution de décoloration		
Méthanol	250 ml	Conserver dans un flacon brun à température ambiante
Acide acétique	50 ml	
Eau distillée	250 ml	
Marqueurs protéiques	PM (kDa)	
Alpha 2 macroglobuline from equine serum	180	
β -galactosidase from E.Coli :	116	
Lactoferrin from human milk	90	
kinase (rabbit muscle)	58	
Fumarase (porcine heart)	48,5	
Lactidéhydrogénase (rabbit muscle)	36	
Triosephosphate isomérase	26	

Annexe I. 5

Modes opératoires des analyses physico-chimiques du lait

✚ Mesure de la densité

➤ Mode opératoire

On verse le lait dans une éprouvette (250 ml) tenue inclinée jusqu'au débordement de lait sur ses côtés. En effet ce débordement est nécessaire, il débarrasse la surface du lait des traces de mousse qui gêneraient la lecture et afin d'éviter la formation de bulles d'air. On remplit l'éprouvette jusqu'à un niveau tel que le volume restant soit inférieur à celui de la carène du lactodensimètre (il est commode de repérer ce niveau par un trait de jauge sur l'éprouvette). L'éprouvette ainsi remplie est placée en position verticale, on plonge doucement le lactodensimètre dans le lait en le maintenant dans l'axe de l'éprouvette et en le retournant dans sa descente jusqu'au voisinage de sa position d'équilibre et on procède à la lecture.

✚ Mesure de l'acidité

➤ Mode opératoire

A l'aide d'une pipette (10 ml) on introduit 10 ml du lait dans un bécher de 100 ml. Au quel on ajoute quelques gouttes (3 à 4) de solution de phénolphthaléine (1%), puis on titre avec une solution d'hydroxyde de sodium (0,1N) jusqu'au début de virage au rose persistant. L'acidité est exprimée en degrés Dornic et donnée par la lecture de millilitres de soude titrée.

✚ Mesure de la matière grasse (méthode acido-butyrométrique de Gerber)

➤ Mode opératoire

• Préparation du butyromètre

A l'aide d'une pipette ou d'une doseuse d'acide, on mesure 10 ml d'acide sulfurique et 0,1 ml d'alcool iso-amylique et on les introduit dans un butyromètre en évitant de mouiller le matériel et méthodes 34 col, ensuite on ajoute 11 ml de lait à l'aide d'une pipette de manière que la pipette soit placée en contact avec la paroi du butyromètre devant être fermé hermétiquement par la capsule. Pour réaliser un mélange homogène du lait avec l'acide sulfurique et l'alcool, on effectue une agitation manuelle de

telle sorte que la base du butyromètre soit placée au centre de la paume gauche de la main et en faisant le mouvement de va et vient par la main droite qui attrape l'ampoule ensuite placée dans une centrifugeuse à une vitesse de 1000 à 1200 tours par minute pendant environ cinq minutes.

- **Lecture**

Elle doit être effectuée rapidement après la centrifugation, le butyromètre étant placé verticalement. On observe que la matière grasse se sépare en une couche transparente, on lit le niveau le plus bas du ménisque supérieur de la colonne grasse et le niveau du ménisque inférieur de la colonne grasse, les traits gravés sur l'échelle du butyromètre représentent des grammes.

- **M** : la valeur atteinte par le niveau supérieur de la colonne grasse.
- **M'** : la valeur atteinte par le niveau inférieur de la colonne grasse.

 **Mesure de l'extrait sec totale**

Mode opératoire

On place une capsule en verre dans un dessiccateur réglé à 125°C et durant 25 minutes, pesé au moyen d'une balance analytique, puis tarer (la masse de la capsule vide en gramme).

- A l'aide d'une pipette (05ml), on verse 03 à 305 ml de lait à analyser dans toute la capsule qui devient homogène. - On ferme la capsule et le résultat est obtenu après 25 minutes.

Annexe I.6

Fiche de dégustation du fromage

Le paneliste ou le dégustateur doit remplir la fiche suivante en donnant un score ou une note pour chaque paramètre et pour chaque échantillon de fromage

Le paramètre est noté de 1 à 4 selon l'intensité de chaque caractère

- ✓ **Note 1 : Très bon**
- ✓ **Note 2 : Bon**
- ✓ **Note 3 : Assez bon**
- ✓ **Note 4 : Mauvais**

Les paramètres sensoriels à apprécier sont :

Aspect visuel (Couleur), Olfaction et arômes, Gout et saveurs, Texture

PANELISTE N° :

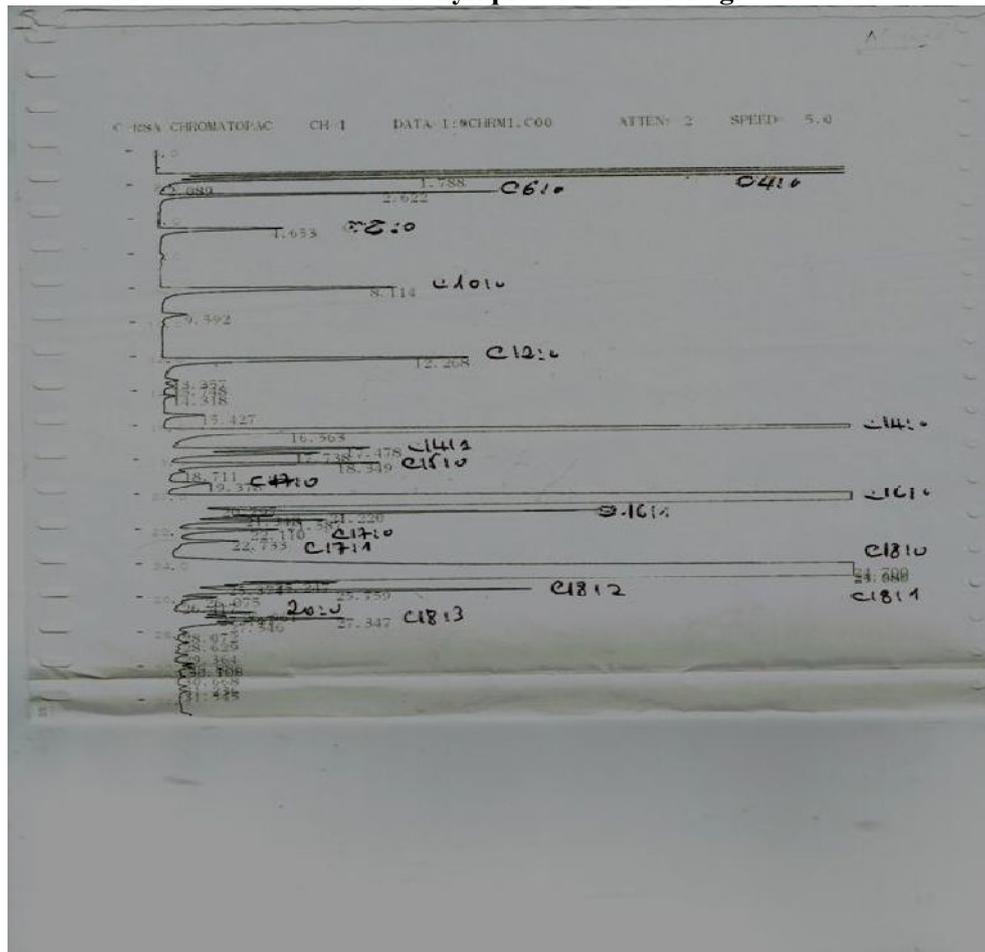
Paramètres	Fromage A (score)	Fromage B (score)
Aspect visuel (Couleur)		
Olfaction et arômes		
Gout et saveur		
Texture		

Table de Kramer (Kramer *et al.*, 1960)

Nombre de dégustateurs	Nombre de fromages dégustés										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3				3-9	3-11	3-13	4-14	4-16	4-18	5-19	5-21
4		4-8	4-11	5-13	6-15	6-18	7-20	8-22	8-25	9-27	10-29
5		5-11	6-14	7-17	8-20	9-23	10-26	11-29	13-31	14-34	15-37
6	6-9	7-13	8-17	10-20	11-24	13-27	14-31	15-35	17-38	18-42	20-45
7	7-11	9-15	11-19	12-24	14-28	16-32	18-36	20-40	21-45	23-49	25-53
8	8-13	10-18	13-22	15-27	17-32	19-37	22-41	24-46	26-51	28-56	30-61
9	10-14	12-20	15-25	17-31	20-36	23-41	25-47	28-52	31-57	33-63	36-68
10	11-16	14-22	17-28	20-34	23-44	26-46	29-52	32-58	35-64	38-70	41-76

11	12-18	16-24	19-31	13-37	26-44	30-50	34-56	37-63	40-70	44-76	47-83
12	14-19	18-26	21-34	25-41	29-48	33-55	37-62	41-69	45-76	49-83	53-90
13	15-21	19-29	24-36	28-44	32-52	37-59	41-67	45-75	50-82	54-90	58-98
14	17-22	21-31	26-39	31-47	35-56	40-64	45-72	50-80	54-89	59-97	64-105
15	18-24	23-35	28-42	33-51	38-60	44-68	49-77	54-86	59-95	65-103	70-112
16	19-26	25-35	30-45	36-54	42-63	47-73	53-82	56-91	64-101	70-110	75-120
17	21-27	27-37	33-47	39-57	45-67	51-77	57-87	62-98	69-107	75-117	81-127
18	22-29	28-40	35-50	41-61	48-71	54-82	61-92	67-103	74-113	81-123	87-134

Annexe I.7
Profil CPG des esters méthyliques de la matière grasse du lait



Annexe II.1

Détermination de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est mesurée en utilisant comme substrat une solution de caséine (sigma) à 1% dans NaOH 0,02M.

1ml de substrat est incubé avec 1ml de la solution enzymatique (dans le tampon phosphate 0,4M pH 6 pendant 10min à 35°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 5ml de TCA à 5% après repos de 15 min, la solution est filtrée. A 1ml de filtrat on ajoute 5ml de la solution réactive (Na₂CO₃, NaOH, CuSO₄, tartrate double de sodium et de potassium) on incube à 35°C pendant 10 min puis on ajoute 5ml du réactif de folin prêt à l'emploi après agitation on incube à 35°C pendant 30 minutes ensuite la D₀ à 660nm est mesurée.

Une unité d'activité protéolytique est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1µg d'acide aminé exprimé en tyrosine par minute (µg tyr/min) dans les conditions d'essai.

Annexe II.2

Tableau de précipitation par addition de sulfate d'ammonium solide (à 25°C).

(Kamoun, 1977)

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C

20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

Annexe III.1

Préparation des dilutions

Une série de dilution de 10^{-1} à 10^{-9} a été effectuée de la manière suivante :

D'une façon aseptique on prélève 1 ml de la solution mère préalablement préparée et homogénéisée qu'on introduit dans un tube de 9 ml d'eau physiologique ce qui nous donne la dilution 10^{-1} , de cette manière on prélève 1 ml que nous introduisant dans autre tube de 9 ml d'eau physiologique pour obtenir la dilution 10^{-2} , et on opère de la même façon pour les autres dilutions

Photos de l'essai de fabrication d'un fromage type « Pâte pressée non cuite



Photo1 : Emprésurage



Photo 2: brassage du caillé



Photo 3: Soutirage du lactosérum



Photo 4: Gâteau du caillé.



Photo 5: Moulage



Photo 6: Pressage



Photo 7 : Salage