

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Djilali BOUNAAMA de Khemis Miliana



Faculté des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Matière

Mémoire du Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention de diplôme

Master

En

« Science de la Matière »

Option :

« Chimie Pharmaceutique »

Thème :

***Extraction et purification d'une protéase coagulant le lait
Extraite à partir du rhizome de gingembre (Zingiber Officinale Rosces)***

Réalisé par :

- YAHIA MAHAMMED ZHOR
- YEKHOU NAIMA

Encadré par :

M^r : MEKHANEG.B

Année Universitaire 2015/2016

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier en premier lieu, Dieu tout puissant de nous avoir donné la force le courage et la patience à fin de réaliser cette étude.

Nos vifs remerciements vont en particulier à Mr MEKHANEG.B de nous avoir proposé ce sujet, accepté de nous encadrer et de diriger notre travail par ses précieux conseils et ses encouragements.

Nos sincères remerciements vont à Mr le président et les membres de jury pour l'honneur qu'ils auront fait en acceptant de juger ce travail.

Nous remercions l'équipe de laboratoire de Biochimie et de Microbiologie de l'université de Khemis-Miliana et laboratoire de contrôle de qualité de la Laiterie d'Arib pour leur contribution et pour leurs aides et leur soutien durant notre période de stage.

Nous tenons tout particulièrement à remercier les enseignants du laboratoire de biochimie et microbiologie, ainsi que tous les enseignants de Département des sciences de la matière qui ont contribué à notre formation universitaire.

C'est avec un réel plaisir que nous adressons nos sincères reconnaissances et notre profonde gratitude à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour réaliser cette étude.

Zhor / Naima

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon travail

A ma Mère,

« Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.

Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer mon amour et la reconnaissance que je te porte.

En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'a toujours entourée ».

A la mémoire de mon père et mon frère, toutes mes condoléances.

A mon frère Hamza,

A ma sœur Sabrina qui m'a donné tout son amour pour reprendre mes études,

A toute ma famille et surtout mes tantes ainsi toutes les personnes que j'aime

A ma chère binette Naima,

A toutes mes amies Fatiha, Meriem, Hayat, Asma,

A toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

ZHOR

Dédicace

Avec une énorme joie Je dédie ce modeste travail aux plus chères personnes de ma vie.

A ma chère mère, symbole de tendresse et d'affection qui m'a donnée le courage et tout ses sacrifices.

A mon cher père, pour le soutien qui m'a apporté durant toute ma vie scolaire et universitaire qui a toujours souhaité me voir dans le bon chemin que j'ai pu lui offrir ce modeste travail comme un signe de témoignage de ce je lui dois, que dieu nous garde ce père extraordinaire.

A mes très chères sœurs

- Wahiba
- Amina et son mari Mohammed et son fils Yousef
- Fatma Zohra et son mari Djilali et ses enfants : Mofida ; Marwa ; Abderrahmane et Goufrane

A mon très cher frère

- Kamel
- Djalal et sa femme Racha

A ma chère fidèle binette yahia mahammed Zhor

A tous les professeurs qui m'ont enseigne leur savoir.

A toutes mes chères amies et toutes les étudiants de 2^{eme} années master chimie pharmaceutique au l'université de Djilali bounaama de khemis- Miliana

En fin, pour tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Naima

Liste des Tableaux

Tableau I.1 : Composition générale du lait de vache.....	04
Tableau I.2 : Composition du lait de quelques mammifères.....	04
Tableau I.3 : Caractéristique de constituants majeurs de caséines.....	06
Tableau I.4 : Caractéristiques des protéines solubles du lait.....	10
Tableau 1.5 : Composition du lait en minéraux.....	10
Tableau I.6 : Teneur moyenne des principales vitamines du lait.....	11
Tableau III.1 : Composition chimique de rhizome de gingembre	24
Tableau IV.1 : Comparaison entre un caillé lactique (coagulation par voie acide) et un caillé présure	30
Tableau IV.2 : Impact de la température sur la coagulation du lait par la présure.....	31
Tableau V.1 : Composition moyennes des différents types de fromages.....	36
Tableau VII.1 : Résultats des analyses physico-chimique de gingembre.....	53
Tableau VII.2 : Caractéristiques de l'extrait enzymatique brut obtenu à partir de 100g de gingembre.....	54
Tableau VII.3 : Concentration en protéine totales du l'extrait enzymatique brut.....	58
Tableau VII.4 : Précipitation de l'extrait enzymatique brut au sulfate d'ammonium (test sur surnagent).....	59
Tableau VII.5 : Précipitation de l'extrait enzymatique brut au sulfate d'ammonium (test sur culot).....	59
Tableau VII.6 : Les résultats d'analyse physico-chimique de lait utilisé pour la fabrication du fromage à pâte fraîche.....	60
Tableau VII.7 : Les résultats des analyses physico-chimiques de produit fini.....	61
Tableau VII.8 : Résultats des analyses microbiologique de fromage à pâte fraîche....	61

Liste des abréviations

AFNOR	: Association Françaises Normalisation.
Abs	: Absence
A°	: Acidité Dornic.
Ap	: Activité protéolytique
Ans	:Années
AA	: Acide aminés
BSA	: Sérum albumine bovin
Clostridium S/R	Clostridium Sulfito-Réducteur
°C	: Degré celsius
CMP	:CaséinoMacropeptide
Ca	: Calcium
CaCl₂	: Chlorure de sodium
Da	: Daltons
°D	: Degré Dornic
EEB	: Extrait enzymatique brut
EC	: Extrait coagulant
ESD	: Extrait sec dégraissé
EST	: Extrait sec total
ES	: Extrait sec
FPLC	: FastPhase Liquide Chromatography
Fig	: Figure
FAO	: Organisation des nations unies pour l'alimentation l'agriculture
GAMT	: Germes Aérobie Mésophile Totaux
G/S	: Gras sur sec
g/mol.	: Gramme par mol
HCl	: Acide chlorhydrique
H	: Humidité
H⁺	Proton d'Hydrogène
[H₃O⁺]	Concentration de H ₃ O ⁺
Kcal	: kilo calorie.
MG	: Matière grasse

M	:Molaire.
Met	:Méthionine
MS	: Matière sèche
NaOH	: Soude
N	: Normalité.
nm	: Nanomètre
P	: Phosphore
PH	Potentiel d'hydrogène
Phe	: Phénylalanine
log	: Logarithme
SAGE	: Service Appui à la Gestion de l'Environnement
SDS	: Sodium Dodécyl Sulfates
S	:Seconde
Tr /min	: Tours par minute
UAC	: Unité Activité Coagulant
UP	: Unité de Présure
V	: Volume
µg	: Microgramme

Liste des Figures

Figure .I.1. Structure primaire de la caséine	08
Figure .I.2. Structure de la micelle de caséine.....	09
Figure III.1. Plantes entière du zingiber officinale Roscoe	21
Figure .IV.1. Phases de la coagulation enzymatique du lait.....	28
Figure V.1. Diagramme de fabrication de fromage frais.....	37
Figure .VI.1. Rhizomes de gingembre.....	38
Figure .VI.2. Rhizomes de gingembre coupé	40
Figure .VI.3. Homogénéisation avec l'acétone.....	40
Figure .VI.4. Filtration +lavage du précipité.....	40
Figure .VI.5. Poudre du Ginger après séchage.....	40
Figure .VI.6. Centrifugeuse à froid	40
Figure .VI.7. Surnageant et culot.....	40
Figure .VI.8. Diagramme d'obtention de l'extrait enzymatique brute de rhizomes de gingembre	41
Figure .VI.9. Spectrophotomètre.....	42
Figure .VI.10. Bain marie à 35°C.....	43
Figure .VI.11. Les déférentes enzymes coagulant	48
Figure .VI.12. Fermentation de lait.....	48
Figure .VI.13. Séparation de lactosérum.....	49
Figure .VI.14. La pâte fraîche.....	49
Figure .VI.15. La crème fraîche.....	49
Figure .VI.16. Fromage frais.....	49
Figure .VI.17. Titrage de lait.....	50
Figure .VI.18. Matière grasse par le butyromètre.....	51
Figure .VII.1. Extrait enzymatique de rhizomes de gingembre.....	54
Figure .VII.2. Effet de température du lait sur l'activité coagulante du l'extrait enzymatique.....	55
Figure .VII.3. Effet de pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique..	56
Figure .VII.4. Effet de CaCl ₂ sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique.....	57
Figure .VII.5. Effet de stabilité de l'enzyme en fonction du temps.....	61

Sommaire

SOMMAIRE

Introduction.....	01
 Chapitre I : Généralité sur le lait	
I.1. Définition.....	03
I.2. Lait cru.....	03
I.3. Composition du lait.....	03
I.3.1.Eau.....	04
I.3.2.Glucides	05
I.3.3.Lipides.....	05
I.3.4.Protéines.....	05
I.3.4.1. Caséine.....	06
I.3.4.2. Protéines du lactosérum	09
I.3.4.3. Protéases peptones.....	09
I.3.5. Minéraux.....	10
I.3.6.Vitamines.....	11
I.3.7. Enzymes.....	11
I.4. Caractérisation du lait.....	12
I.4.1. Organoleptiques.....	12
I.4.2. Physico-chimique.....	12
 Chapitre II :Succédanées de présure	
II. 1 Définition.....	14
II. 1 .1 Origine et Dénomination	14
II. 1.2 Composition.....	14
II. 1.2.1. Chymosine.....	14
II.1.2.2. Pepsine	15
II. 1 .3. Propriété spécifique exigées du succédané de présure	15
II. 1. 4. Enzymes coagulants d'origine végétale	16
II. 1.5. Enzymes coagulants d'origine animale.....	16
II. 1.6. Les enzymes coagulants d'origine microbiennes.....	17
II.1.6. 1. Origine bactérienne.....	17
II.1.6.2. Origine fongique.....	18

Chapitre III. Gingembre

III.1. Généralité.....	19
III.2. Définition.....	19
III.3. botanique de la plante.....	19
III.3.1. Bio systématique de gingembre.....	19
III.3.2. Dénomination.....	20
III.3.3. Description botanique.....	20
III.4. Ecologie.....	22
III.4.1. Exigence climatique	22
III.5. Histoire de l'utilisation de gingembre en phytothérapie.....	22
III.6. Composition de gingembre.....	23
III.6.1. Parties utilisées.....	23
III.6.2. Principe actifs.....	23
III.7. Utilisation et posologie du gingembre.....	23
III.8. Composition chimique du rhizome de gingembre.....	24

Chapitre IV. Coagulation du lait

IV.1. Généralité.....	26
IV.2. Type de coagulation.....	26
IV.2.1. Coagulation par voie acide.....	26
IV.2.2. Coagulation par voies enzymatique.....	27
IV.2.2.1. Mécanisme de la coagulation enzymatique.....	28
IV.2.3. Coagulation mixte.....	30
IV.3. Facteurs influençant à l'activité coagulante.....	30
IV.3.1. Concentration en enzyme.....	30
IV.3.2. Température.....	31
IV.3.3. pH.....	32
IV.3.4. Teneur en CaCl ₂	32

Chapitre. V. Fromage

V. 1. Généralité.....	33
V.2. Définition.....	33
V. 3. Différents type de fromage.....	33
V.4. Condition nécessaire à la fabrication fromagère.....	34

V. 4.1. Fromage frais.....	34
V.5. Fabrication du fromage.....	34
V. 5.1. Préparation du lait.....	34
V.5.2. Coagulation.....	35
V.5.3. l'égouttage.....	35
V.5.4. Salage.....	35
V.5.5. l'affinage.....	35
V.6. Intérêt nutritionnel.....	36

Chapitre.VI. Matériel et Méthode

VI.1. Matériel biologique.....	38
VI.2. Produit et appareillage.....	38
VI.3. Contrôle physico-chimique.....	39
VI.3.1. Détermination du taux d'humidité (%).....	39
VI.3.2. Détermination de la matière sèche (MS%).....	39
VI.4. Extraction de l'extrait enzymatique de gingembre.....	39
VI.4.1. Contrôle physico-chimique.....	42
VI.4.1.1. Détermination le taux de protéine totaux.....	42
VI.4.1.2. Détermination de l'activité coagulante.....	42
VI.4.1.3. Détermination des conditions optimales de coagulation	44
VI.4.1.3.1. Détermination de la température optimale	44
VI.4.1.3.2. Détermination de pH optimale.....	45
VI.4.1.3.3. Détermination de la concentration de CaCl ₂	45
VI.4.1.4. Rendement en protéines bruts.....	46
VI.5. Méthode de purification.....	46
VI.5.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium.....	46
VI.5.2. Rendement de pré-purification.....	47
VI.6. Essai de fabrication de fromage à pâte fraîche « petit suisse ».....	47
VI.6.1. Préparation de lait	47
VI.6.2. Emprésurage.....	47
VI.6.3. Découpage.....	48
VI.6.4. Séparation	48
VI.7. Contrôle physico-chimique.....	50
VI.7.1. Lait	50

VI.7.1.1.Détermination de l'acidité.....	50
VI.7.1.2.Détermination du pH.....	51
VI.7.1.3.Détermination de l'extrait sec total (EST).....	51
VI.7.1.4.Détermination de l'extrait sec dégraissé (ESD).....	51
VI.7.1.5. Détermination de la matière grasse.....	51
VI.7.2.Fromage.....	52
VI.7.2.1. Détermination du pH.....	52
VI.7.2.2. Détermination de l'acidité.....	52
VI.7.2.3. Détermination de l'extrait sec total (EST).....	52
VI.7.2.4.Détermination de l'extrait sec dégraissé(ESD).....	52
VI.8.Contrôle microbiologique.....	52

Chapitre VII. Résultats et Discussion

VII.1.Résultats physico-chimiques.....	53
VII.1.1.Rhizomes de gingembre	53
VII.1.2.Extrait enzymatique brut.....	53
VII.1.2.1.Caractérisation de l'extrait enzymatique brut de gingembre.....	53
VII.1.2.2.Détermination des conditions optimales de coagulations.....	55
VII.1.2.2.1. Influence de température sur l'activité coagulante.....	55
VII.1.2.2.2. Influence de pH sur l'activité coagulante.....	56
VII.1.2.2.3. Influence de la concentration de CaCl ₂	57
VII.1.2.3.Taux de protéine totale.....	58
VII.1.3.méthode de purification	58
VII.1.3.1.Résultat de la précipitation au sulfate d'ammonium.....	60
VII.1.3.2.Rendement en protéines pré-purification.....	60
VII.1.4.Le lait.....	60
VII.1.5.Fromage à pâte fraîche.....	60
VII.2.Détermination de la stabilité de l'enzyme en fonction de temps.....	61
VII.3.Résultats du contrôle microbiologiques.....	62
Conclusion	63

Référence bibliographique

Annexe

ملخص

تقييم البدائل النباتية مثل الزنجبيل في إعداد إنزيمات تخثر الحليب، هو بديل للمنفعة التجارية. ركزت دراستنا على توصيف المخثر المستخرج من جذور الزنجبيل واستخدامه كبديل عن المنفعة لتخثر الحليب. يتميز هذا الأنزيم بنشاط تخثر 5,88 وحدة التخثر /مل، أقل من المنفعة، و تركيز بروتين 89,28 مغ /مل و قوة تخثر 1411,76/1

يتم تحديد الظروف المثلى لنشاط الإنزيم من قبل المعلمات (درجة الحرارة 50 درجة مئوية، ودرجة الحموضة 6.4، $CaCl_2$ من تركيز 0,05)

هذا المخثر لديه استقرار في درجات حرارة أقل من 50 درجة مئوية، وفي نطاق درجة الحموضة 3-5، 5، يتم تخزينه في درجات حرارة منخفضة 18- درجة مئوية لصنع الجبن.

محاولة من صنع الجبن الطازج تسمح لتسليط الضوء على قدرات صنع الجبن من هذا الإنزيم. وبناء على نتائج نستنتج أن المخثرة من جذور الزنجبيل يمكن أن تحل محل المنفعة في صنع الجبن

كلمات مفتاحية: الحليب، المنفعة، المخثرة، جذور الزنجبيل، الجبن.

Résumé

La valorisation des succédanés d'origine végétale telle que le Gingembre (*Zingiber officinal*) dans la préparation des enzymes coagulant le lait, constitue une alternative à la présure commerciale.

Notre étude a porté sur la caractérisation de la coagulase extraite à partir du rhizome de gingembre (*Zingiber officinal*).

L'extrait coagulant a une activité coagulant (5.88 U.A.C /ml) inférieure à celle de la présure avec une concentration en protéine de 89.28 mg /ml et une force (1/1411.76).

Les conditions optimales d'activité de l'enzyme sont déterminées par des paramètres (Température 50°C, pH 6.4, Concentration en CaCl₂ de 0.05).

Cette coagulase présente une stabilité à des températures inférieure à 50°C, et dans l'intervalle de pH de 3 à 5.5, elle se conserve à des basses températures -18°C.

Un essai de fabrication d'un fromage à pâte fraîche « petit suisse » a permis de mettre en évidence l'aptitude fromagère de notre extrait.

Selon les résultats obtenus nous concluons que la coagulase du rhizome de gingembre peut remplacer la présure dans la fabrication fromagère.

Mots clés : Présure, coagulation, Rhizome de gingembre, fromage.

Abstract

The valuation of vegetable substitutes such as Ginger (*Zingiber officinale*) in the preparation of milk-coagulating enzymes is an alternative to the commercial rennet.

Our study focused on the characterization of coagulase extracted from the rhizome of ginger (*Zingiber officinale*).

The coagulants to extract a coagulant activity (5.88 U.A.C / ml) lower than that of the rennet with a protein concentration of 89.28 mg / ml and a force (1 / 1411.76).

The optimum conditions of activity of the enzyme are determined by parameters (temperature 50 ° C, pH 6.4, CaCl₂ concentration of 0.05).

This coagulase has a stability at temperatures less than 50 ° C and in the pH range from 3 to 5.5, it is stored at low temperatures -18 ° C.

A trial of making a fresh cheese "little Switzerland" allows to highlight the cheese making capacity of our extract.

Based on the results we conclude that the coagulase of the ginger root can replace rennet in cheese making.

Keywords: rennet, coagulation, Ginger Rhizome, cheese.

Partie

Bibliographique

Introduction Générale

Introduction

De tout temps, la fabrication de fromage à traité le lait par la présure eu vue de préparer le caillé, cette présure était extraite de l'estomac des jeunes veaux. Sous l'action de cette enzyme, la caséine colloïdale du lait est transformé en para caséinate de calcium insoluble, le caillé formé se contracte facilement, provoquant la séparation du sérum, et les opérations ultérieures telles que le découpage du caillé, elles permettent d'expulser les dernières traces de sérum présent **(Finc, 1973)**.

De plus l'accroissement global de la demande en fromage à induit une augmentation importante de la production mondiale, accompagnée par une diversité de produit fromagères et la mise au point de fromage de plus en plus appétissants nécessitant ainsi l'utilisation de quantités de plus en plus importantes pour cette agent coagulant que le marché mondiale ne peut facilement satisfaire. **(Ramet, 1984)**.

Dans l'industrie fromagère la coagulation du lait est une étape important au cours de laquelle l'utilisation d'un agent coagulant est indispensable. La présure obtenue à partir de la caillette de veau avant servage, reste l'agent coagulant le plus ancien le plus utilisé et le mieux adapté à la transformation du lait en fromage **(Lenoire et al., 1985)**, toute fois sur obtention est relativement couteux pour les mesures suivantes

Abattage de jeune veaux, affectant lourdement plus le cout tant par la faiblesse du rendement en viande que par les dépenses à consentir en alimentation, en soins.

La protéase du gingembre est d'origine végétale peut fonctionner comme un potentiel enzyme de coagulation du lait dans la fabrication du fromage, ce qui peut aussi être moins cher et complémentaire de la présure. **(Mallik et al., 2011)**.

L'objectif de cette étude est

- Extraction et caractérisation de l'extrait brut de gingembre.
- Purification partielle et caractérisation de fraction partiellement purifiée.
- Essai de fabrication d'un fromage à pâte fraîche à base d'extrait enzymatique et comparaison avec celui de la présure.

Le manuscrit comporte trois grandes parties.

La première partie est une approche bibliographique permettant d'évoquer la connaissance de bases et le contexte d'étude .A cet effet, nous avons rassemblé des données sur le lait cru et le fromage frais et leur composants, ainsi la coagulation du lait par l'extrait des gingembres.

Et la deuxième partie contrôle physico-chimique et microbiologique de fromage frais et des éléments entrant dans la fabrication.

La troisième partie c'est la partie expérimentale dans laquelle nous présentons

- La 1^{ere} partie le matériel et les méthodes.
- La 2^{eme} partie sera réservée à la discussion des différents résultats

Nous terminons par une conclusion générale regroupe les point essentiels de ce travail.

Chapitre I

**Généralités sur le
lait**

I.1. Définition

Le lait est un liquide alimentaire, opaque blanc mat, légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre, à l'odeur peu marquée et au goût douceâtre, sécrété, après parturition par la glande mammaire des animaux mammifères femelles, pour nourrir leur(s) nouveau-né(s). (**Marcel et Mazyoyer, 2007**).

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères, comme la vache, la chèvre et la brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant. Du point de vue physicochimique, le lait est un produit très complexe. Une connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physiques et chimiques est indispensable à la compréhension des transformations du lait et des produits obtenues lors des différents traitements industriels (**Carole et Vignola, 2002**).

I.2. Lait cru

Le lait cru destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « le produit intégral de la traite total ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée ne comportant pas de colostrum » (**Aurélien, 2010**).

I.3. Composition du lait

Le lait est un liquide physiologique élaboré par les femelles de mammifères à partir de molécules transportées par le sang afin de nourrir les petits et d'assurer la croissance. La composition du lait est adaptée à cette fonction, elle est donc variable selon l'âge du petit, l'instant de la journée, le moment de la tétée. (**Roudaut et al., 2005**).

Tableau I.1. Composition générale du lait de vache (Mahaut et al., 2003).

Constituants majeurs	Variations limites (%)	Valeur moyenne (%)
Eau	85,5 – 89,5	87,5
Matière grasse	2,4 – 5,5	3,7
Protéines	2,9 – 5,0	3,2
Glucides	3,6 – 5,5	4,6
Minéraux	0,7 – 0,9	0,8

La composition du lait varie selon l'animal, la race, l'âge, l'alimentation, la saison et le moment de la traite (Martin et al., 1995 et Krevzet et al., 1996).

Tableau I.2. Composition du lait de quelques mammifères (Vignola, 2002).

Animaux	Eau %	Matière grasse %	Protéines %	Glucides %	Minéraux %
Vache	87.5	3.7	3.2	4.6	0.8
Chèvre	87.0	3.8	2.9	4.4	0.9
Brebis	81.5	7.4	5.3	4.8	1.0
Chamelle	87.6	5.4	3.0	3.3	0.7
jument	88.9	1.9	2.5	6.2	0.5

I.3.1.Eau

C'est l'élément quantitativement le plus important. Elle conditionne l'état physique des autres constituants, en intervenant dans l'émulsion de la matière grasse et la dispersion des micelles de caséines lors de la transformation (75 à 80%) de cette eau se retrouve dans le lactosérum. de plus l'eau intervient dans le développement bactérien et les altérations du lait. (Mahaut et al., 2003).

I.3.2. Glucides

Le sucre principal du lait est le lactose, disaccharide constitué par l'association d'une molécule de glucose et d'une molécule de galactose. On ne relève que 70 mg.L⁻¹ de glucose et 20 mg.L⁻¹ de galactose ainsi que des traces d'autres glucides.

Le lait contient une cinquantaine d'oligosaccharides bien répertoriés présents à l'état libre, mais en quantités souvent négligeables (0,1 g/litre). **(FAO, 2002)**.

Le constituant principal de la matière sèche du lait est le lactose qui présente une moyenne de 50 g/l **(Linden et Lorient., 1994)**

D'autres glucides peuvent être présents en faible quantité, comme le glucose et le galactose qui proviendraient de l'hydrolyse du lactose, en outre certains glucides peuvent se combiner aux protéines **(Amiot et al., 2002)**.

I.3.3. Lipides

Les lipides du lait n'ont aucun rôle dans le phénomène de coagulation. Ils sont constitués en majeure partie de triglycérides qui représentent 97 à 99% des lipides totaux. Ces lipides se solidifient à température ambiante **(Boyaval, 1995)**.

La composition des lipides du lait varie avec l'espèce ; 35g/l environ pour celui de la femme et de la vache ; 40 à 50 g/l pour les autres espèces.

En plus des triglycérides, on trouve des phospholipides, stérols cholestérol notamment qui constituent le reste (1 à 3 % des lipides totaux) **(Linden et Lorient, 1994)**.

I.3.4. Protéines (matière azotée)

La fraction azotée est la partie la plus complexe du lait. Elle est probablement moins bien connue dans sa constitution et dans les transformations qu'elle peut subir **(Vétier et al., 2000)**. Cette fraction est constituée des protéines 30 g.l⁻¹ pour le lait de vache. **(Bonfoh et al., 2005)**. On y retrouve également des substances non protéiques.

Parmi les protéines on distingue essentiellement les caséines, les protéines du lactosérum et les protéases peptones **(Vétier et al., 2000)**.

I.3.4.1. Caséines

On distingue essentiellement trois types de caséines : la caséine α_s , la caséine β et la caséine κ (Tableau I.3.) Ces caséines représentent environ 78 % des composés azotés du lait.

La caséine précipite seul lorsqu'on acidifie le lait à pH 4,6 ou lorsqu'on fait réagir un enzyme spécifique comme la chymosine (Cheftel et al., 1985).

Tableau I.3.Caractéristique de constituants majeurs de caséines (Cayot et Lorient.,1998).

	Caséines α_1	Caséines α_2	Caséines β	Caséines κ
Proportion(%)	36	10	34	13
Concentration (g.L-1)	9,6	6,7	9	3,5
Masse moléculaire(Da)	23600	25250	24000	19000
Nombre de d'acides aminés	199	207	209	169
Phosphore(%)	1,1	1,3	0,56	0,2
Glucide(%)	0	0	0	5
Proline (%)	17	10	35	20
Résidus cystéine /mol	0	2	0	2
pHi	4,4	-	4,9	3,7
Sensibilité à chymosine	+	-	+	+++
Fixation du calcium	++	+++	+	0

Légende: - : insensible ; + : peu sensible ; ++ : sensible ; +++ : très sensible

1. Caséines α_S

Caséine α_{S1}

C'est la protéine la plus importante en masse, elle possède 199 AA et un poids moléculaire de 23 614 g/mol. Cette caséine est très sensible au calcium au pH normal du lait (pH=6,7), quelle que soit la température et en présence de calcium, on constate une formation de flocons.

Caséine α S2

Elle représente 8 à 11% de la micelle de caséine, possède 207 AA et 13 à 10 phosphates (il s'agit de α S2 ou α S3 ou α S4 ou α S6 selon le nombre de phosphates) et son poids moléculaire estimé varie de 25150 à 25390 g/mol.

2. Caséines β et γ

Caséine β

Représentant 25 à 35% de la micelle, avec ses 209 AA et ses 5 groupements phosphates, elle possède beaucoup d'analogie avec la caséine α S1.

Caséine γ

Il s'agit des fragments C-terminaux résultant de la protéolyse de la caséine β par la plasmine.

3. Caséine κ

Une grande majorité de cette caséine se trouve à la surface de la micelle, accessible à la présure. Il s'agit d'une protéine de 169 AA, phosphorylée (Serine 149) comportant 2 variante génétiques A et B. Elle comporte un constituant majeur non glycosylé (**Fig.I.1**) et des constituants mineurs glycosylés dont la structure précise est élucidée (**Eigel et al., 1984**).

La coagulation du lait se fait suite à la protéolyse de cette caséine par la présure qui scinde la molécule en deux parties, la partie N-terminale (1-105) ou para caséine et le fragment C-terminal (106-169) ou caséino macropeptide (CMP) aux propriétés très contrastées.

Dans le caillé, seules sont récupérées les caséines α S1, α S2 et β et la para caséine κ tandis que le CMP se retrouve dans le lactosérum. Il est à noter que le CMP contient tous les glucides, quand ils existent, sur les Thréonine 131, 133, 135 et 136 (variant A uniquement).

PyroGlu-Glu-Gln-Asn-Gln-Glu-Gln-Pro-Ile-Arg(10)-Cys-Glu-Lys-Asp-Glu-Arg-Phe-Phe-Ser-Asp(20)

Lys-Ile-Ala-Lys-Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr(30)-Val-Leu-Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu(40)-Asn-Tyr-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Val-Ala-Leu (50)-Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr (60)- Tyr-Ala-Lys-Pro-Ala-Ala-Val-Arg-Ser-Pro (70)-Ala-Gln-Ile-Leu-Gln-Trp-Gln-Val-Leu-Ser (80)- Asp-Thr-Val-Pro-Ala-Lys-Ser-Cys-Gln-Ala(90)-Gln-Pro-Thr-Thr-Met-Ala-Arg-His-Pro-His (100)- Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro (110)-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys-Thr-Glu-Ile-Pro (120)- Thr-Ile-Asn-Thr-Ile-Ala-Ser-Gly-Glu-Pro (130)-Thr-Ser-Thr-Pro-Thr-Ile*-Glu-Ala-Val-Glu (140)- Ser-Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Glu-Ala*-Ser-Pro (150)-Glu-Val-Ile-Glu-Ser-Pro-Pro-Glu-Ile-Asn (160)-

PThr-Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val-OH (169)



Glu (1).....Phe (105)Met (106)-.... Val(169) (Action de la chymosine)

Fig.I.1.Structure primaire de la caséine (**Eigel et al., 1984**).

Micelle de caséine

La micelle de caséine est une particule de taille variant de 100 à 500 nm avec un diamètre moyen de 180 nm (**Amiot et al., 2002 ; Fox,2004**), elle est formée par l'association des caséines α_1 , α_2 , β , κ et de quelques fragments peptidiques les caséines γ et de composants salins dont le calcium et le phosphate. Son poids moléculaire moyen est de l'ordre de 108 Da et renferme entre 20 000 et 150 000 molécules de caséine.

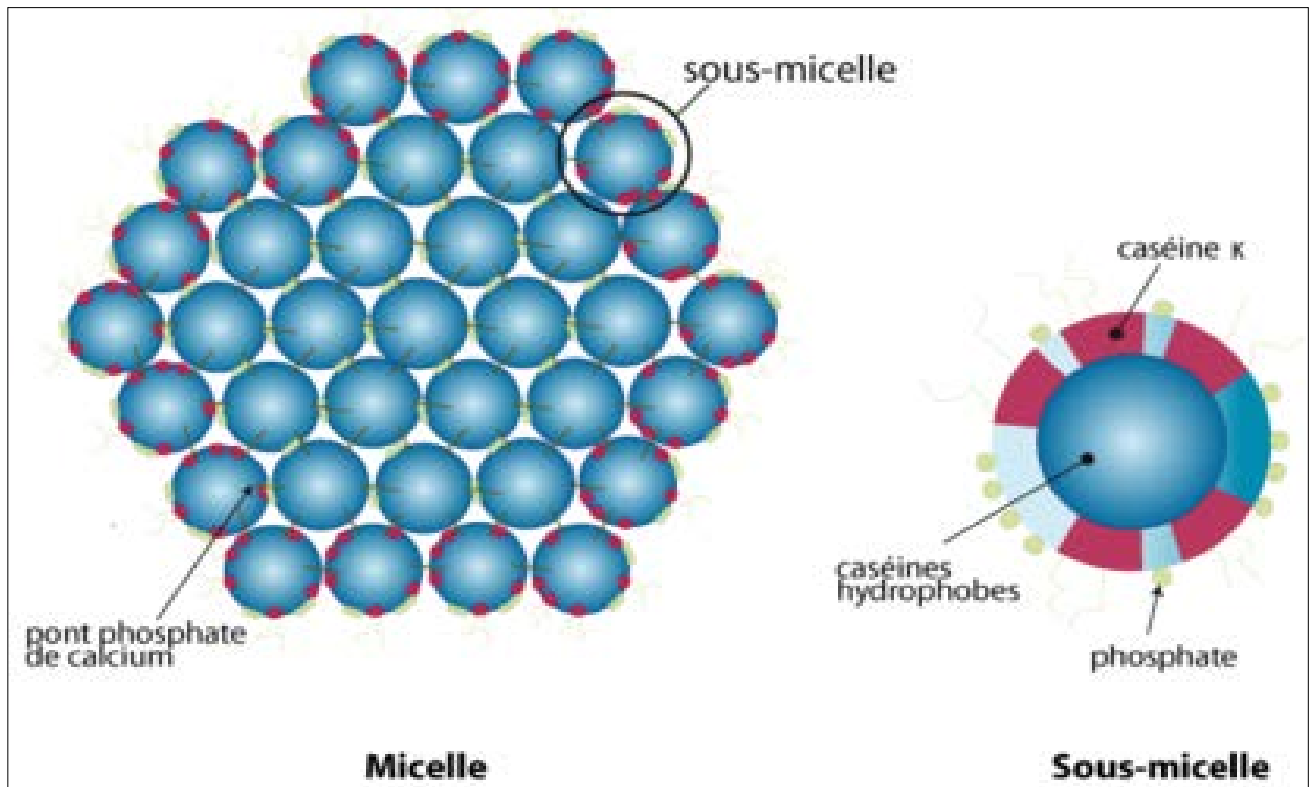


Fig. I.2. Structure de la micelle de caséine (Amiot et al., 2002).

I.3.4.2. Protéines du lactosérum

Elles représentent 17 % de la matière azotée. Elles se retrouvent dans le lactosérum et sont qualifiées de solubles parce qu'elles ne précipitent pas au pH de la caséine entière. Les deux principales protéines du lactosérum sont l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline (**tableau I.4.**) elles sont les plus immunogènes et leur composition en acides aminés est très différente de celle des caséines en ce qu'elles contiennent moins d'acide glutamique et proline mais sont plus riches en acides soufrés (**Ramet et Weber, 1980**). Le lactosérum referme également des protéoses-peptones qui sont des substances glycoprotéiques peu abondantes dans le lait (**Vetier et al., 2000**).

I.3.4.3. Les protéases peptones

Certaines, obtenue sous l'action de protéases, seraient constituées de fragments de caséines β et de glycoprotéines analogues à la membrane entourant les globules gras. Elles possèdent une forte activité de surface utilisée en industrie panair. Ces protéases peptones donnent une partie du goût du gouda et des fromages à pâte dure. (**Vierling, 2008**).

Tableau I.4.Caractéristiques des protéines solubles du lait (**Cayot et Lorient., 1998**).

Nature	Composition (g.L ⁻¹)	Poids moléculaire et nombre de résidus	pH	caractéristiques
B- Lactoglobuline	2,7	18000(162)	5,2	2 ponts disulfures
A-lactalbumine	1,5	163(132)	5,1	4 ponts disulfure /groupement thiol libre
sérumalbumine	0,5	65000(582)	4,7	17 ponts disulfures
Immunoglobuline	0,7	150000 à1800000	7,5	Majorité anticorps
Protéose-peptone	0,5	-	-	Protéine très hétérogène
Protéines mineures	0,30	43000 à086000	-	Composition complexe et hétérogène

I.3.5.Minéraux

Sont présents dans le lait à 7 g/l environ. Les plus représentés en quantité sont le calcium, le phosphore, le potassium et le chlore. On retrouve ces matières salines soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble. Certains minéraux se trouvent exclusivement à l'état dissous sous forme d'ions (sodium, potassium et chlore) et son particulièrement bio disponibles. Les autres (calcium, phosphore, magnésium et soufre) existent dans les deux fractions. (**Libouga et al., 2013**).

Tableau 1.5. Composition du lait en minéraux (Julliard et richard, 1996).

Minéraux	Teneur (mg/kg)	Minéraux	Teneur (mg/kg)
Sodium (Na)	445	Calcium (Ca)	1180
Magnésium (Mg)	105	Fer (Fe)	0,50
Phosphore (P)	896	Cuivre (Cu)	0,10
Chlore (Cl)	958	Zinc (Zn)	3,80
Potassium (K)	1500	Iode (I)	0,28

1.3.6. Vitamines

Toutes les vitamines sont présentes dans le lait frais en quantité plus ou moins grande à l'exception de la vitamine B₁₂. A noté la richesse en vitamine B₁₂. (Apfelbaum et al., 2004).

Le lait est une bonne source en vitamines, on distingue les vitamines hydrosolubles (vitamines B1, B2, B6) et les vitamines liposolubles (Vitamine A, D, E, K) (Benyahia, 2013).

Tableau I.6. Teneur moyenne des principales vitamines du lait (Debry, 2001).

Vitamines	Teneur moyenne (µg/ml)
Vitamines liposolubles	
Vitamine A (+ carotènes)	40µg/100ml
Vitamine D	2,4µg/100ml
Vitamine E	100µg/100ml
Vitamine K	5µg/100ml
Vitamines hydrosolubles	
Vitamine C (acide ascorbique)	2/ µg 100ml
Vitamine B1 (thiamine)	45µg/100ml
Vitamine B2 (riboflavine)	175µg/100ml
Vitamine B6 (pyridoxine)	50µg/100ml
Vitamine B12 (cyanocobalamine)	0,45µg/100ml
Niacine et niacinamide	90µg/100ml
Acide pantothénique	350µg/100ml
Acide folique	5,5µg/100ml
Vitamine H (biotine)	3,5µg/100ml

1.3.7. Enzymes

Leurs nombre est important : plus de 60 ; leur qualité faible et leur grande activité sont responsables d'importantes modification du lait. Elles sont pour origine l'excrétion et la sécrétion par les tissus mammaire ou la sécrétion par les microorganismes .leur activité dépend du pH et de la température. Elles sont détruites en général à 70°C. (Veirling , 2008).

I.4. Caractéristiques du lait

I.4.1. Organoleptiques

a. Couleur

Le lait est un liquide blanc mat, opaque à cause des micelles de caséinates, ou parfois bleuté ou jaunâtre du fait du bêta carotène ou de la lactoflavine contenue dans la matière grasse. (Sousa et Malcata, 2002).

b. Odeur

Toujours faible et variable en fonction de l'alimentation de la femelle productrice (Sousa et Malcata, 2002).

c. Saveur

Elle est douceâtre, faiblement sucrée, en raison de sa richesse en lactose dont le pouvoir sucrant est inférieure à celui du saccharose (Sousa et Malcata, 2002).

d. Viscosité

La viscosité en fonction de l'espèce, on distingue : Un lait visqueux chez les monogastriques (jument, ânesse, carnivores, et femme), on parle de lait albumineux.

Un lait moins visqueux chez les herbivores (lait de brebis plus visqueux que celui de la vache), ce lait est dit caséineux (Sousa et Malcata, 2002).

I.4.2. Physico-chimiques

a. Densité

Elle oscille entre 1,028 et 1,034. Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20°C. La densité des laits de grand mélange des laiteries est de 1,032 à 20°C. La densité des laits écrémés est supérieure à 1,035. Un lait à la fois écrémé et mouillé peut avoir une densité normale. (Vierling, 2008).

b. Acidité de titration ou acidité Dornic

Le lait présente une acidité qui peut être titrée par une solution d'hydroxyde de sodium en présence de phénophtaléine à 1 % comme indicateur coloré. Cette acidité est exprimée en degré dornic, c'est-à-dire en décigramme d'acide lactique par litre. Le mouillage du lait provoque une diminution de son acidité qui se situe normalement entre 15 et 18°D pour un lait frais. (Germain, 2011).

c. Point de congélation

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques les plus constantes. Sa valeur moyenne, si l'on considère des productions individuelles de vache, se situe entre -0,54 °C et - 0,55°C. (Mathieu, 1998).

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau puisque la présence de solides solubilisés abaisse le point de congélation. Il peut varier de -0,530°C à - 0,575°C avec une moyenne à -0,555°C. (Bourgeois et al., 1996).

d. pH

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais a un pH de l'ordre de 6,7. S'il y a une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H_3O^+) et donc une diminution du pH, car : $pH = \log 1/[H_3O^+]$

A la différence avec l'acidité titrable qui elle mesure tous les ions H^+ disponibles dans le milieu, dissociés ou non (acidité naturelle + acidité développée), reflétant ainsi les composés acides du lait. (Germain, 2011).

Chapitre II



**Succédanée de
présure**

II. Présure

II. 1. Définition

La présure (mélange de chymosine et de pepsine) est une enzyme extraite à partir d'estomac des jeunes ruminants, elle est la plus anciennement utilisée en industrie fromagère.

Il est bien connu que le principal agent coagulant du lait est la chymosine, c'est la principale enzyme de coagulation du lait présent dans la présure (**Mahaut et al., 2003**).

II. 1.1 Origine et Dénomination

La présure de veau est la préparation coagulante traditionnelle la plus utilisée pour la coagulation du lait (**Alais, 1984 ; Wigley, 1996**). De moindres quantités sont obtenues à partir de l'estomac de chevreau et d'agneau.

La dénomination présure est réservée à l'extrait coagulant provenant de la troisième poche de l'estomac appelée *abomasum* ou caillette. Elle renferme deux enzymes actives. La chymosine est la protéase majeure responsable d'un moins 85% de l'activité coagulante totale le complément est apporté par la pepsine. On observe les plus fortes teneurs en chymosine chez les animaux non sevrés ; dès que la ration alimentaire renferme des aliments solides et que le jeune animal commence à brouter, la proportion de chymosine chute très fortement ; à l'inverse, la pepsine devient dominante et caractérise la sécrétion stomacale du mammifère adulte (**Cogitore, 1982**).

II. 1.2. Composition

II. 1. 2. 1. Chymosine

La chymosine est la protéase majeure responsable d'un moins 85% de l'activité coagulante totale (**Ramet, 1997**). Elle est synthétisée sous forme de prochymosine, activée sous l'action du suc gastrique. Elle subit alors une conversion en chymosine active.

La chymosine est une holoprotéine, de poids moléculaire voisin de 30 kDa (**Scriban, 1999**). Elle est stable entre pH 5 et 6 ; son activité est optimale à pH voisin de 5 ; elle est inactivée à pH 7,5 et est dénaturée à pH 8. Sa température optimale d'action est voisine de 40°C. L'inactivation thermique a lieu dès 50°C, elle est totale à 61°C (**Lenoir et al., 1985 ; Scriban, 1999**).

❖ Production de la chymosine fermentaire

Grâce au développement du génie génétique, il est actuellement possible de produire de la chymosine à partir de micro-organismes (**Beldarrain et al., 2000 ; Munoz et al., 2004**).

La chymosine fermentaire résulte du clonage du gène responsable de la production de la chymosine à partir de l'estomac de veau sur certains micro-organismes. Les plus utilisés sont : *Escherichia coli*, *Kluyveromyces* et *Aspergillus*.

Cette méthode constitue l'une des voies porteuses d'espoir pour la synthèse d'enzymes utilisables dans l'industrie laitière.

II.1.2.2 Pepsine

La pepsine est le constituant mineur de la présure dont la sécrétion gastrique ne devient prépondérante qu'après sevrage (**Ramet, 1997**). Elle est produite sous forme d'un précurseur inactif, le pepsinogène. Il passe par acidification sous la forme active : la pepsine de poids moléculaire 35 kDa (**Alais, 1984**).

A l'opposé de la chymosine, la pepsine possède une activité protéolytique élevée et une faible activité coagulante. D'après **Broome et Hickey, (1990)**, 20% de l'activité coagulante est assurée par la pepsine dans la fabrication fromagère (Cheddar, Emmental,...).

La pepsine est relativement stable à des pH compris entre 5 et 5,5. Son activité enzymatique est plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat.

C'est une enzyme thermosensible en solution après 55°C. Elle est dénaturée à des températures à 70°C (**Graiday, 1978**).

II. 1 .3. Propriété spécifique exigées du succédané de présure

Les enzymes de remplacement de la présure doivent répondre aux critères suivants (**Ramet, 1997**)

- Une bonne solubilité dans l'eau.
- Une odeur et une couleur faibles ou nulles.
- Une activité coagulante bonne et une durée de consommation raisonnable.
- Une absence de toxicité pour le consommateur et un degré de pureté élevé pour éviter tout accident de prolifération de microorganismes indésirables.

- La synérèse du coagulum au cours de l'égouttage et les modalités de l'affinage devrait permettre d'obtenir les caractéristiques usuelles des fromages dans un délai sensiblement égal à celui de la présure.
- Les rendements fromagers doivent être très proches ou supérieurs à ceux révélés lors de l'emploi de la présure.

II. 4. Enzymes coagulants d'origine végétale

Contrairement à la présure qui est spécifique à la κ -caséine, les *aspartyl-protéases* des plantes peuvent hydrolyser les caséines α , β et κ , ce qui provoque une acidité excessive, (**Simões et Faro, 2004**). Plusieurs préparations coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures (**Ramet, 1997**).

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**).

Cependant il a été conclu que cet agent coagulant se caractérise par une activité protéolytique excessive ce qui confère un goût amer au fromage. D'autres végétaux fournissent des coagulasses telles que les ficines extraites du latex du figuier, la papaine du papayer, la bromélaïne de l'ananas etc... L'activité coagulante de ces préparations végétales est très variable car elle est fortement influencée par l'état de maturité de la plante et par les conditions de collecte et de stockage. De ce fait, l'emploi de ces protéases coagulantes est toujours resté limité aux aires locales de production (**Eck, 1987**).

II. 5. Enzymes coagulants d'origine animale

Des substituts de présure sont produits par plusieurs mammifères comme le chameau (**Siboukeur, 2005**), le buffle (**Mohanty et al., 2003**)...et même par les viscères de poissons.

L'étude comparative des activités coagulantes et protéolytiques de ces enzymes a révélée qu'elles présentent des caractéristiques proches de celles de la présure (**Polaina et Macabe, 2007**).

De nombreuses protéases d'origine animale ont fait l'objet d'expérimentation en vue d'une utilisation potentielle en fromagerie.

Les pepsines ont une activité protéolytique assez voisine de celle de la chymosine ; leurs sensibilités aux variations des facteurs de milieu sont semblables sauf pour l'effet pH ; elles ont un caractère plus acide avec un optimum au voisinage de pH 1,5-2,0 (**Ramet, 1997**).

Certains succédanés d'origine animale peuvent être considérés comme des produits de remplacement acceptables de la présure de veau.

La pepsine extraite à partir de la muqueuse gastrique du phoque et de l'estomac du lapin. L'obtention de la pepsine sous forme cristallisée à partir d'extraits de muqueuse gastrique bovine a été réalisée pour la première fois par (**Northrop, 1929**). La deuxième enzyme gastrique obtenue sous forme cristallisée été la pepsine. (**Banga-Mboko et al., 2002**)

II. 6. Enzymes coagulants d'origine microbiennes

L'utilisation des préparations enzymatiques microbiennes a été soumise à une stricte réglementation, imposant des contrôles hygiéniques (liés à leur production et extraction) et toxicologiques sévères, afin d'éviter tout risque de toxicité lié à la présence d'antibiotiques et/ou d'aflatoxines (**Devilliet et al., 1983**). On distingue deux catégories de protéases microbiennes : les succédanés d'origine bactérienne et les succédanés d'origine fongique.

II.6.1. Origine bactérienne

De multiple espèce de bactéries ont été étudiées notamment dans les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* tels que *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus coagulans*. Les résultats ont été en général décevants en raison de l'activité protéolytique généralement très élevée de ces protéases par rapport à celle de la présure. La protéase de *Bacillus cereus* dégradait rapidement la caséine entière. Du cheddar préparé par la protéase de *Bacillus subtilis* présentait une flaveurs acceptable ; cependant, le rendement était très faible suite à une protéolyse excessive (**Ramet, 1997**).

En Algérie, (**Matoub, 2000**) a mis en évidence la possibilité d'obtenir une coagulase à partir d'une souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée, mais leur utilisation n'a pas dépassé le stade expérimental en raison de leur prix de revient et de la réglementation stricte.

II.6.2. Origine fongique

Actuellement, c'est sur les protéases d'origine fongique que l'on fonde le plus d'espoir. Contrairement aux protéases bactériennes, les protéases fongiques ont donné des résultats meilleurs, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure (**Luquet ,1987**).

Parmi les substituant de la chymosine, les enzymes de *Mucor pusillus* et de *M. miehei* ont connu le plus large développement. De par ses propriétés, la protéase de *M. miehei* se rapproche le plus de la présure animale, notamment pour ce qui concerne le ratio activité coagulante/ activité protéolytique (**Joyeaux, 1982**).

De plus, les enzymes fongiques se caractérisent par une stabilité thermique analogue à celle de la présure (**Goursaud., 1993**).

Chapitre III



**Généralité sur le
gingembre**

III.1. Généralités

Gingembre protéase est une cystéine-protéase, appartenant à la famille peptidase C1 (famille de la papaine), qui est caractérisée par un résidu cystéine au centre actif de l'enzyme (Choi et al., 1999). Jusqu'à présent, des études approfondies ont été axées sur l'activité protéolytique (PA), purification, analyse de la structure, et attendrissage de propriétés de gingembre protéase (Naveena et al., 2004; Kim et al., 2007). Appelée protéase de gingembre "Zingibain" selon la nomenclature classique.

III.2. Définition

Le gingembre est connu dans de nombreux pays du monde pour sa valeur culinaire, mais aussi pour ses vertus thérapeutiques, depuis plus de 5 000 ans. Il peut être utilisé pour combattre les infections, la fatigue, les douleurs musculaires et, surtout, les problèmes digestifs (vomissements, diarrhées...). Le gingembre a également des propriétés antioxydants et antibactériennes.

III.3. Botanique de la plante**III.3.1. Biosystématique du gingembre**

Le Zingiber officinale, fait partie de la famille des Zingibéracées qui compte 1500 espèces environ dont en voici quelques exemples : les Curcuma (C.longa, C.zedoria), les Hedychium (H.acuminatum), les Zingiber (Z.cassumunar, Z.officinale), etc (Borget, Maisonneuve et Larose, 1991).

Le Zingiber Officinale est classé botaniquement comme suit (Franhomme et Limoges, 1995).

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Monocotylédones

Ordre : Scitaminées

Famille : Zingibéracées

Genre : *Zingiber*

Espèce : *Officinale*

III.3.2. Dénominations. (Maistre, 1964)

· Noms vulgaires

- Gingembre (Français)
- Ginger (Anglais)
- Ingwer (Allemand)
- Arabe (زنجبيل)

III.3.3. Description botanique

Le *Zingiber Offinale* Roscoe est une plante herbacée vivace, dont le nombre chromosomique est $2n=22$. Sa partie souterraine est constituée par un rhizome couvert de feuilles écailleuses et pourvu à sa partie inférieure de racines adventives cylindriques. Ce rhizome, rameux horizontalement, porte des tubercules palmés, charnus, plus tard fibreux.

Lors de leur arrachage à maturité, c'est-à-dire après fanage de la partie aérienne de la plante, les rhizomes frais de gingembre se présentent sous la forme d'organes irréguliers, allongés, de la grosseur du pouce et présentant des ramifications obtuses dans un même plan.

Leur volume et leur poids varient selon les conditions écologiques et les soins apportés à la culture ; les plus gros rhizomes peuvent peser plus de 200g et avoir jusqu'à 15cm et davantage. (FAO et SAGE, 2005).

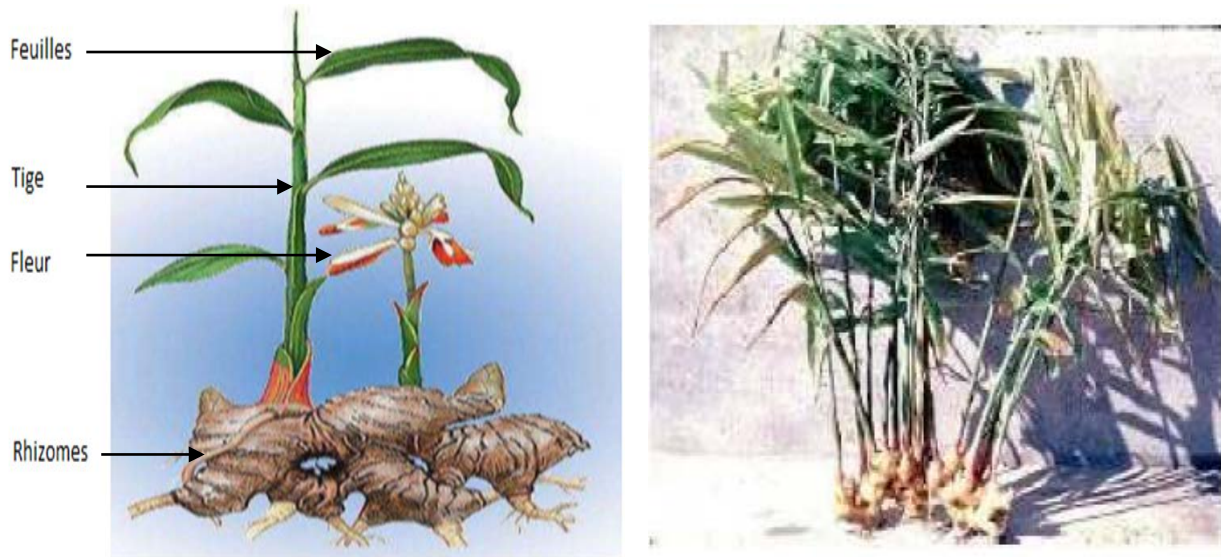


Fig. III.1.Plante entière du *Zingiber officinale* Roscoe ([www .maep.gov/filtech.gingembre.htm](http://www.maep.gov/filtech.gingembre.htm) (2010).

Les tiges de la plante sont verticales, couvertes par les gaines des feuilles. Ils sont en général stériles et mesurent de 0.60 m à 1.50 m de haut.

Les feuilles sont alternes, sessiles et distiques. Certaines sont pourvues d'un limbe linéaire, lancéolé, acuminé 15 -20 cm*2-3cm se prolongeant en une gaine transparente sur la tige.

Les inflorescences sont supportées par des scapes (hampes) de 20 cm de hauteur, partant du rhizome. Ces hampes sont dépourvues de feuilles mais garnies d'écailles engainantes, celles de la partie inférieure étant courtes et imbriquées, les autres étant glabres, lâches et progressivement plus longues, jusqu'à mesurer 4 cm.

Les fleurs naissent par une ou deux à l'aisselle d'une bractée. Le calice, verdâtre, a 1 cm de longueur et possède 3 sépales unis à la base. Les trois pétales de la corolle, alternée avec les divisions du calice extérieur, sont unis à leur base sur 2 cm environ avant de se séparer en 3 lobes acérés. Ils sont d'un jaune plus ou moins orangé, parfois strié de pourpre violacé.

III.4. Ecologie**III.4.1. Exigences climatiques**

Conformément à son origine indienne ou malaisienne supposée, le gingembre demande un climat tropical ou subtropical où la température est élevée au moins une partie de l'année.

Il exige un grand ensoleillement mais aussi une pluviosité élevée ; la plante prospère dans les régions où la pluviométrie moyenne annuelle est supérieure à 2000 mm. Dans les régions moins arrosées, il est nécessaire de recourir à l'irrigation. Le gingembre s'accommode d'une saison sèche, qui provoque le repos végétatif, pourvu que cette période ne soit pas trop longue. **(Vernon et Richard, 1976). (FAO et SAGE, 2005).**

III.4.2. Exigences pédologiques

Le gingembre donne son meilleur rendement sur un sol bien structuré, travaillé, drainé et sain. Il s'accommode de nombreux sols : sols de jardin c'est-à-dire humifère et assez léger, sols d'origine volcanique, sols de formation latéritique provenant de la décomposition de gneiss et qui se ressuint bien, sols alluvionnaires, sols sablo-limoneux, sols argilo-siliceux. Mais il est déconseillé de le cultiver sur un sol facile mentinondable ou trop humide car le gingembre craint l'humidité en excès, les sols caillouteux ou argileux (argiles très compactes) sont aussi à proscrire. **(FAO et SAGE, 2005).**

III.5. Histoire de l'utilisation du gingembre en phytothérapie

Le gingembre est cultivé dans les zones ensoleillées et tropicales, principalement en Asie (Inde, Chine, Népal). On a retrouvé des traces écrites de son utilisation datant de plus de 3 500 ans, mais il semble que ses qualités soient connues depuis plus de 5 000 ans. Il est connu dans nos régions grâce au commerce méditerranéen des Romains et des Grecs. Il est souvent utilisé comme épice pour agrémenter les plats. En Malaisie et en Inde, d'où le gingembre est originaire, c'est une plante médicinale très connue, notamment dans la médecine Ayurveda indienne qui est très ancienne. Aujourd'hui, il est utilisé dans le monde entier pour traiter les affections intestinales, les états grippaux et les baisses de forme. **(Vernon et Richard, 1976).**

III.6.Composition du gingembre**III.6.1. Parties utilisées**

Le rhizome est la partie utilisée en phytothérapie.

III.6.2.Principes actifs

Le rhizome du gingembre contient de l'oléorésine constituée de shogaol et de gingérol, qui ont des effets anti-inflammatoires et antiémétiques (limitant la nausée et les vomissements) et accélèrent le transit intestinal. On y trouve la présence d'huile essentielle, d'amidon, de nombreuses vitamines (B1, B2, B3, C) et minéraux (manganèse, phosphore, magnésium, calcium, sodium, fer) qui ont pour effet de dynamiser l'organisme. **(Zafimahova ., 2006).**

III.7.Utilisation et posologie du gingembre**Dosage**

Le gingembre peut être consommé quotidiennement, et même plusieurs fois dans la journée, sous différentes formes : tisane, boisson, frais râpé... Pour bénéficier des effets du gingembre, il faut en consommer au minimum 500 mg par jour.

Le gingembre s'utilise de diverses façons.

En usage interne, il se prend en poudre, de 500 à 1000 mg par jour, en teinture avant les repas (10 à 20 gouttes), en infusion avec 150 ml d'eau chaude pour 1 g de gingembre 3 fois par jour. On peut le consommer frais en tranches ou râpé, sachant que 10 g de gingembre frais correspondent à 1 à 2 g de gingembre séché. Les doses sont adaptées à l'usage que l'on souhaite en faire : nausées de grossesse, post-opératoires, mal des transports, douleurs...

En usage externe, on peut se frictionner avec l'huile essentielle ou la teinture mère, directement sur la partie à traiter, ou bien soigner les maux de gorge en se gargarisant avec une cuillère à café de teinture diluée dans de l'eau tiède. Une technique chinoise consiste à appliquer des cataplasmes infusés avec du gingembre sur les articulations douloureuses **(Ranaivonjoany ,2005).**

III.8. Composition chimique du rhizome de gingembre

Le rhizome est très riche en amidon, 10% à l'état frais et 60% à l'état sec, il renferme 0.25 à 3 % d'huile essentielle selon l'état de la matière, fraîche ou sèche, et de l'oléorésine (5 à 8%). Il contient aussi des protéines, lipides, hydrates de carbone, minéraux, vitamines et des enzymes protéolytiques appelés zingibaïne. Il possède une odeur très aromatique et une saveur chaude et brûlante. L'odeur caractéristique du gingembre est due à la présence d'huile essentielle que l'on peut obtenir par entraînement à la vapeur d'eau. Par contre, la saveur brûlante de l'épice n'est pas imputable à cette huile essentielle mais à d'autres substances non volatiles et qu'il faut par conséquent extraire à l'aide de solvants : cette extraction donne « l'oléorésine de gingembre » (Belew et al., 2009)

Tableau III.1. Composition chimique moyenne pour 100 g de rhizomes frais de Gingembre. (Belew et al., 2009)

Composants	Quantité (g)
Glucides (amidon en majorité)	10
Protides	1,80
Lipides	1,50
Eau	85,00
Fibres alimentaires	>1,00
Minéraux	Quantité (mg)
Potassium	112,60
Phosphore	144,00
Calcium	43,00
Magnésium	157,00
Sodium	33,00
Fer	14,00
Cuivre	0,40
Vitamines	Quantité (mg)
Vitamines C (acide ascorbique)	35
Vitamine B1 (Thiamine)	0,05
Vitamine B2 (Riboflavine)	0,20
Vitamine B3 (nicotinamide)	5,20

La vitamine C disparaît complètement dans le gingembre séché. Et les vitamines B1 et B2 sont aussi en quantités très réduites dans le rhizome de gingembre sec réduit en poudre. (Zafimahova, 2006).

Chapitre IV

A decorative scroll frame with a thick black border. The top-left and top-right corners are curled inward, and the bottom-left corner is curled outward, resembling a scroll. The text "Coagulation du lait" is centered within the frame.

Coagulation du lait

IV.1. Généralité

Coagulation du lait est une étape décisive dans la fabrication de toutes les variétés de fromage. Il s'agit en général de la transformation du lait liquide en un gel, appelé coagulum ou caillé qui, après un certain nombre de transformations, deviendra un fromage (**El-Bendary *et al.* 2007; Shieh *et al.* 2009; Mohamed Ahmed *et al.*, 2010**).

Elle correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel des caséines qui flocculent puis se soudent pour former un caillot lactique ou présure, retient selon le cas plus ou moins de matière grasse, de minéraux, d'eau et des éléments solubles, ce qui a une incidence directe sur les rendements fromagers. On peut provoquer la coagulation par acidification, par l'action d'une enzyme ou encore par l'action combinée des deux (**Vignola, 2002; Fox *et al.*, 2004; Belitz *et al.*, 2009**).

D'après (**Gelais et Tirard, 2009**) La coagulation du lait peut se caractériser par trois paramètres

- Le temps de prise (temps de floculation) ;
- Le taux (vitesse du raffermissement) ;
- La fermenté maximale du gel ;

IV.2. Type de coagulation

En technologie fromagère on distingue trois types de coagulation

- ❖ Coagulation par vois acide
- ❖ Coagulation par vois enzymatique
- ❖ Coagulation mixte

IV.2.1. Coagulation par vois acide

Pendant la coagulation acide, le pH du lait diminue et les propriétés physicochimiques des micelles de caséine sont profondément modifiées.

L'abaissement du pH par acidification réduit en effet jusqu'à la neutralisation de la charge négative des micelles de caséine, due à la fixation des protons H^+ libres par certains acides aminés (acide glutamique, acide aspartique et la phospho-sérine).

Au pH 5,2 (à 20°C), elles deviennent suffisamment instables pour former un début d'agglomération, alors qu'au pH 4,6 (point isoélectrique de la caséine) la charge électrique est devenue complètement neutre, entraînant ainsi la coagulation complète.

De plus, l'acidité du milieu a pour effet d'augmenter la solubilité des minéraux, de sorte que le calcium et le phosphore organiques de la micelle passent graduellement en solution dans la phase aqueuse. Il s'ensuit donc un caillé partiellement déminéralisé qui laisse facilement traverser le lactosérum.

Le caractère acide du caillé va autoriser un allongement significatif de la durée de conservation au froid des produits. (Fox *et al.*, 2004; Tamime, 2006; Belitz *et al.*, 2009).

Selon Brule et Lenoir, (1997) la coagulation par voies acide dépend de plusieurs facteurs

- ✓ La concentration en protéines ;
- ✓ Les conditions d'acidification (pH, vitesse d'acidification, température) ;

IV.2.2. Coagulation par voies enzymatique

Un grand nombre d'enzyme protéolytique d'origine animale, végétale ou microbienne, ont les propriétés de coaguler le complexe caséine. La présure (mélange de chymosine et pepsine), sécrétée dans la caillette des jeunes ruminants nourris au lait, est l'enzyme coagulante la mieux connue et son mécanisme d'action est bien établi. (Boularab, 2005).

La présure est une enzyme protéolytique utilisée pour la fabrication de fromage affinés (type cheddar, etc.) et de la caséine. Son substrat spécifique est la caséine κ qu'elle hydrolyse à une température de l'ordre de 35°C.

La protéolyse conduit à une déstabilisation de caséines micellaire et libère deux molécules, la para caséine κ et une macro peptide ou caséinoglyco peptide soluble, renfermant 20 à 30 % de glucides et une séquence de 64 acides aminés.

Cette action spécifique accentuée par la présence de Ca et P est dite réaction primaire de la présure, elle est très rapide et constituée avec la réaction lente (tertiaire, non spécifique) de protéolyse générale (Vierling, 2003).

IV.2.2.1 Mécanisme de coagulation enzymatique

La coagulation du lait par la présure se déroule en trois étapes désignées communément par

- ❖ L'hydrolyse enzymatique de la caséine κ . (phase primaire)
- ❖ L'agrégation des micelles déstabilisées. (phase secondaire)
- ❖ La réticulation et la formation du gel. (phase tertiaire) (Mahaut *et al.*, 2003).

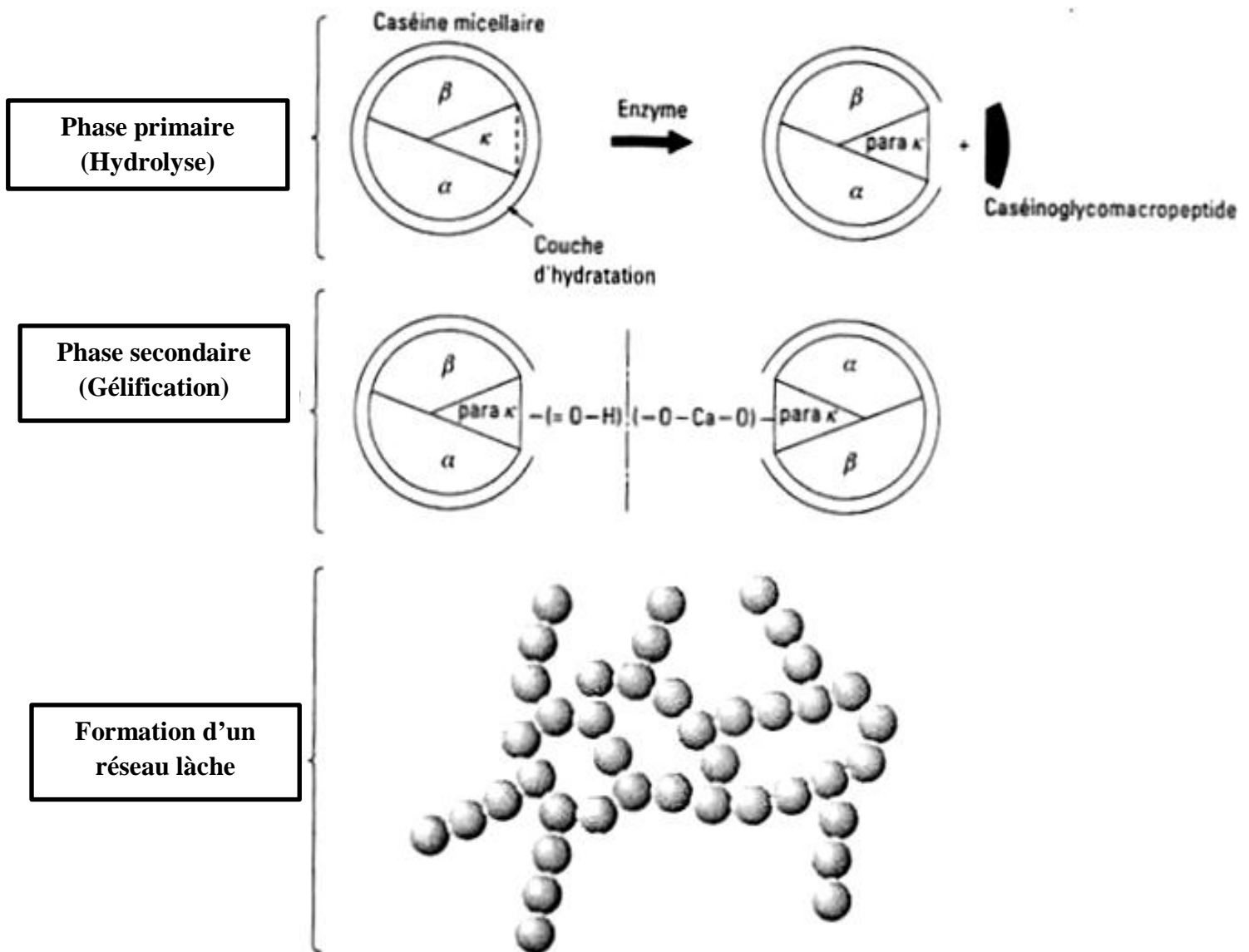


Fig.IV.1 : Phases de la coagulation enzymatique du lait

- **1^{ère} phase (hydrolyse enzymatique)**

La phase primaire ou enzymatique déclenche la coagulation par hydrolyse spécifique de caséine κ au niveau de la phénylalanine (105) et méthionine (106). Selon (**Khalid et al., 1992**) Il résulte de cette coupure deux segments inégaux possédant des caractéristiques différentes.

- ✓ **Le para caséine** : segment de 1 à 105, basique, hydrophobe et liée aux caséines α_s et β siège de la coagulation proprement dite (formation du coagulum).
- ✓ **La caséine macro peptidique** (appelée aussi glycopeptide) segment de 106 à 169, acide hydrophile et libre qui passe dans le lactosérum.

- **2^{ème} phase ou dite d'agglomération**

La réaction secondaire de la coagulation est purement chimique et nécessite la présence d'ions calcium et phosphate qui interviennent dans la formation du gel par polymérisation de para caséines. Plusieurs hypothèses ont été émises expliquer le mécanisme de la formation du gel, suite à un phénomène de polymérisation par condensation de deux molécules de para caséines κ . Les ions calcium initient la polymérisation en formant des ponts salins, alors que les ions phosphates conduisent à la fermeture du cycle de la polymérisation, avec l'apparition d'une valence libre. Celle-ci est capable de s'accrocher à nouveau à un autre cycle similaire et permettre ainsi la condensation avec d'autres molécules, le mécanisme conduit à la formation d'un réseau protéique plus au moins lâche qui confère au coagulum son caractère gel (**Green et al., 1987**).

Selon (**Mahaut et al., 2003**) la réaction secondaire ne commence que lorsque le taux d'hydrolyse de la caséine κ atteint 80 à 90%.

- **3^{ème} phase ou de protéolyse générale**

Les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations : des liaisons de nature variée s'établissent entre les micelles (électrostatiques, hydrophobes et salines) pour former un gel constitué par un réseau lâche emprisonnant le lactosérum et la matière grasse. (**Scriban, 1999**).

IV.2.3.Coagulation mixte

Elle résulte de l’action conjuguée de la présure et de l’acidification .Cette méthode est utilisée pour l’obtention de fromages frais (petits-suisse, demi-sels) et de fromages à pâte molle (camembert). (Mahaut et al.,2003).

Dans les deux cas, après formation de coagulum celui-ci s’exsude et se détache du lactosérum.

C’est la synérèse du caillé ou égouttage. Ce phénomène de synérèse est rapide pour le coagulum par emprésurage et lent pour le coagulum acide (Lenoir, 1985).

Tableau IV.1 Comparaison entre un caillé lactique (coagulation par voie acide) et un caillé présure (coagulation par voie enzymatique) (Vignola., 2002).

Paramètre	Type de caillé	
	Lactique	présure
Temps de floculation	long (de 6 à 15 heures)	court de 10 à 30 min
pH	faible <4,60	élevée (6.5 à 6.7)
Minéralisation	faible (0,1g Ca/100g)	élevée (1 à1.2 g)
Structure micellaire	détruite	état micellaire
Teneur en eau	élevée	faible
Pouvoir tampon	faible	élevée
Teneur résiduel en lactose	élevée	faible
Type de mixture	plastique, fragile	élastique solide
Durée de conservation	Faible (quelques semaines)	élevée quelque moins

IV.3. Facteurs influençant à l’activité coagulante

IV.3.1. Concentration en enzyme

Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en enzyme, ce qui peut se formaliser selon l’équation suivante (Mahaut et al ., 2003)

$$t_c = (K/E) + t_a$$

Avec

t_c : temps de coagulation (s).

K : inverse de la constante de vitesse.

E : concentration en enzyme.

t_a : temps écoulé entre la fin de la réaction enzymatique et le point de coagulation (s).

IV.3.2. Température

Le phénomène de coagulation est fortement dépendant de la température

- ❖ Au-dessous de 10°C, la coagulation du lait ne se produit pas.
- ❖ Dans l'intervalle 10 à 20° C, la vitesse de coagulation est lente.
- ❖ Au-dessus de 20°C, elle augmente progressivement jusqu'à 40 à 42°C, au-delà elle diminue.
- ❖ Au-dessus de 65°C, il n'y a plus de coagulation, l'enzyme est inactivée

La température influe considérablement sur l'étape de l'interaction micellaire relativement à son action sur l'étape de l'hydrolyse enzymatique (**Gelais et Tirard, 2009**).

Tableau IV.2. Impact de la température sur la coagulation du lait par la présure (**Gelais et Tirard, 2009**).

Température	Impact
<10°C	Il n'y a pas de coagulation mais l'enzyme agit quand même.
10-20°C	La coagulation est lente
30-42°C	Il y a une augmentation progressive de la vitesse de coagulation.
42-55°C	La vitesse de coagulation diminue.
55°C et +	Il y a absence de coagulation.

IV.3.3. pH

L'abaissement du pH du lait entraîne un temps de coagulation plus court. Cela résulte d'une part d'un effet sur l'activité de l'enzyme, dont le pH optimal d'action sur la caséine k est de 5,5, d'autre part de la diminution de la stabilité des micelles, liée à la neutralisation des charges et de la libération d'ions calcium à partir des complexes dissous et colloïdaux (**Mahaut et al ., 2003**).

IV.3.4. Teneur en CaCl₂

L'addition de CaCl₂ entraîne une augmentation du calcium ionisé et du calcium colloïdal ayant pour conséquence une augmentation de la taille des micelles (plus la dimension de la micelle est grande, plus le temps de coagulation est court. (**Mahaut et al., 2003**).

Le calcium joue un rôle positif dans la coagulation du lait par la présure. L'addition des sels de calcium augmente considérablement la fermeté et la vitesse de formation du caillé, alors que le temps de coagulation va diminuer jusqu'à des concentrations en chlorure de calcium d'environ 0,01M. Ces améliorations sont dues à l'augmentation de la taille des micelles, l'abaissement du pH et à la dissociation des groupements phosphoriques et carboxyliques des protéines (**Vignola, 2002; Mahaut et al., 2002**).

Chapitre v



Fromage

V. Fromage

V.1. Généralité

Le fromage est défini par la FAO comme étant un produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir d'une matière d'origine exclusivement laitière suivante

Lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisée seule ou en mélange et coagulée en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse. La teneur minimale en matière sèche du produit ainsi défini doit être de 23g /100g de fromage. **(FAO, 2008).**

V.2. Définition

Le fromage selon la norme codex, et le produit affiné, de consistance molle ou mi-dure, dure ou entrait-dure qui peut enrober et dans lequel rapport protéines de lactosérum : caséines ne dépasse celui de lait **(Catherine, 2005).**

Il est défini aussi comme un produit obtenu par égouttage après coagulation du lait, de la crème, du lait écrémé ou partiellement écrémé du babeurre ou du mélange de certains ou tous ces produits.

Le lait servant à la fabrication du fromage peut provenir des différentes espèces animales **(Boudier et Luquet, 1981).**

V. 3. Différents types de fromage

- ❖ Fromage frais ou pâtes fraîches ;
- ❖ Fromage à double présentation ;
- ❖ Pâtes molles ;
- ❖ Fromage à pâtes persillées ;
- ❖ Fromage à pâtes pressées ;

V.4. Conditions nécessaires à la fabrication fromagère

Les conditions nécessaires et favorables à un déroulement de la fabrication fromagère sont les suivantes

- L'activité coagulante doit être bonne dans les conditions physiques et chimiques rencontrées dans les laits soumis à la transformation : pH, température, force ionique, concentration en substrat caséine, absence d'inhibiteurs enzymatique.
- Le comportement rhéologique du gel après floculation doit permettre d'effectuer les traitements de l'égouttage dans un délai acceptable et d'obtenir un fromage présentant les caractéristiques de compositions et de rendement souhaitées.
- Les modalités de l'affinage doivent conduire à une évolution des propriétés. **(Simon et al., 2002)**

V.4.1. Fromage frais

Fromage frais à caille essentiellement lactique, produits très humides et périssables, qui ne sont généralement pas ou très peu affinés. Extrait sec de 30 % à moins de 18 %. Coagulation lente du lait (24 à 30 h) avec pas ou peu de présure (2 à 5 ml pour 100 l) à température base. La pâte est généralement lissée et pour certaines spécialités, on y incorpore des épices ou de la crème fraîche. **(Aurélien, 2010)**.

V.5. Fabrication du fromage

La transformation du lait en fromage a permis de conserver des éléments nutritifs du lait sur des périodes plus ou moins longues **(Gelais et Tirard, 2009)**.

Le processus fromage début avec la préparation du lait, les deux étapes principales de l'élaboration d'un fromage sont ensuite la coagulation et l'égouttage suivi accessoirement de l'affinage après salage.

V.5.1 .Préparation du lait

Comprend éventuellement une phase de traitement thermique du lait voire une étape de maturation.

Le fromage peut également ajuster les taux de matière grasse (écrémage partielle, apport de matière grasse) et azoté (ajouté de poudre de lait) (**Catherine, 2005**).

V.5.2 .Coagulation

Peut se produire sous l'effet de l'acidification ou par des enzymes ou encore les deux (coagulation mixte) elle conduit à l'obtention d'un gel (**Gelais et Tirard,2009**).

V.5.3 .l'égouttage

Est l'étape de séparation du caillé (phase solide) et de lactosérum (phase liquide) composées d'eau et des matières solubles que le lactose, les sels minéraux et les protéines solubles.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la vitesse de synérèse permis des facteurs.

Facteurs liée à la composition du lait. (**Vignola, 2002**).

- Teneurs en gras ;
- Teneur en protéines ;
- Teneur en caséines ;
- Teneur en lactose ;

Facteurs liés à la technologie

- Homogénéisation ;
- PH ;
- Température ;
- Pression ;
- Brassage ;

V.5.4. Salage

Peut être fait dans la masse (salage des grains de caillé), en surface (salage sec) ou dans un bain de saumure (**ECK,1987**).

V.5.5.l'affinage

Il consiste en une digestion enzymatique du caillé sous l'action des agents coagulations et des micro-organismes et conduit à l'obtention d'un fromage affiné (**Cathrine, 2005**).

Selon (ECK,1987)les enzymes qui agissent au cours de l’affinage sont

- ✓ Les enzymes engagées dans le catabolisme et le métabolisme des sucres et l’acide organique ;
- ✓ Les enzymes engagées dans l’hydrolyse des protéines ;
- ✓ Les peptides d’origine microbienne ;
- ✓ Les systèmes actifs sur les acides aminés et les acides gras ;
- ✓ Les lipases ;

V.6.Intérêt nutritionnel

Le fromage est le plus ancien mode de conservation du lait, il est né à partir de recettes empiriques qui sont toujours utilisées à l’heure actuelle.

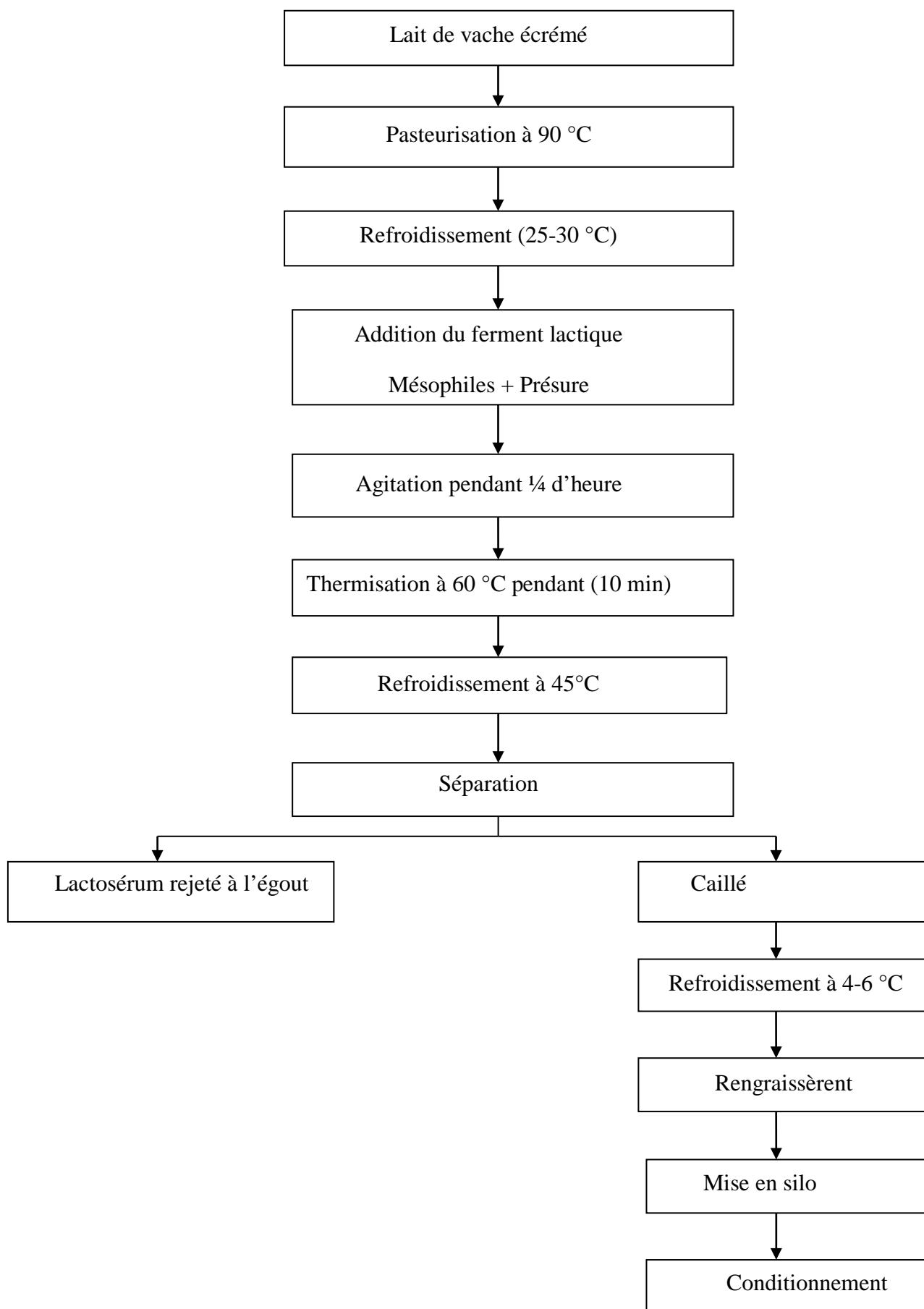
Le pourcentage minimum d’extrait sec est de 23% cependant certains fromage ont une teneur en matière sèche de 15% et doivent porter la mention obligatoire « plus de 82% d’humidité ».

Ceux qui ont une teneur en matière sèche de 11% ont une mention obligatoire « plus de 82% d’humidité ».

Le fromage est un aliment protidique par excellence, la teneur en protide varie de 10 à 30% (Catherine,2005).

Tableau.V.1. Composition moyennes des différents types de fromages (Pernodet,1987).

Les types de fromage	protéines%	lipides%	Calcium. (mg /100g)	Kcal /100g
Fromage frais	10	0à9	100à160	50 à 150
Pâtes molles	20	20à28	150à380	260à350
Pates presse non cuite	24à27	24à29	657à865	326à384
Pates presse cuite	27à29	28à30	900à1100	390à400
Pates persillées	20	27à32	722à870	414

Fig.V.1. Diagramme de fabrication de fromage frais(Luquet, 1987).

Partie

Expérimentale

Chapitre VI



Matériel et Méthode

Dans ce chapitre nous présentons les techniques analytiques et les protocoles expérimentaux utilisés pour la réalisation des travaux envisagés. L'étude a débuté à partir du Mismars au début du mois de mai 2016.

Cette étude a été effectuée au niveau de l'université de Khemis Miliana au niveau de

- Laboratoire de biochimie.
- Laboratoire de microbiologie.
- Laiterie d'Arib (laboratoire de physicochimie et de microbiologie).

VI.1. Matériel biologique

- ✚ Gingembre a été utilisé sous forme de rhizome frais acheté au niveau de marché.
- ✚ La présure : est fourni par la laiterie d'Arib.
- ✚ Lait : en poudre LOW HEAT type LOYA.



Fig. VI.1. Rhizomes de gingembre.

VI.2. Produit et appareillage

Tous les produits et appareils que nous avons utilisé pour notre expérimentation figurant en annexe (1).

VI.3. Contrôle physico-chimique**VI.3.1. Détermination du taux d'humidité (H%)**

Indice qualificatif qui exprime en pourcentage la teneur en eau par étuvage. est Déterminé par la méthode classique.

Mode opératoire

Mettre une capsule vide à l'étuve à 105°C pendant 1 h, peser 2 g de rhizome de gingembre et la mettre dans cette dernière puis remettre à l'étuve pendant 3 à 5 heures, puis peser.

La teneur en eau, exprimée en pourcentage en masse de produit, est donnée par la formule

$$H\% = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \text{ (Simpson William, 1999).}$$

Ou :

m_0 : Poids de l'échantillon avant séchage(g).

m_1 : Poids de l'échantillon après séchage(g).

H% : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

VI.3.2. Détermination de la matière sèche (MS%)

D'après le taux d'humidité on peut déterminer la matière sèche par la formule suivant

$$MS\% = 100 - H\% \text{ (AFNOR, 1981).}$$

VI.4. Extraction de l'enzyme brute du gingembre

Epluché puis coupé en dés de 100 g de gingembre puis lavage à l'eau distillée ensuite on fait un congélation à 23°C après l'homogénéisation avec un mélangeur avec acétone 1/5 (P/V) pendant 15 à 20 min on fait la filtration additionnée par lavage du précipité à l'acétone puis on sèche à l'air pendant 24h après cette séchage on broie ce produit dans 1/20 de tampon phosphate (pH 7), ensuite filtration à travers l'air, puis le liquide est centrifugé à 5000 tr/min pendant 20 min, et le surnagent de l'extrait est obtenu.



VI.2. Rhizomes de gingembre coupée



Fig. VI.3. Homogénéisation avec l'acétone.

Fig.



Fig. VI.4. Filtration + lavage du précipité.



Fig. VI.5. Poudre du Ginger après séchage.



Fig. VI.6. Centrifugeuse à froid.



Fig. VI.7. Surnageant et culot.

Le protocole d'extraction est résumé en diagramme

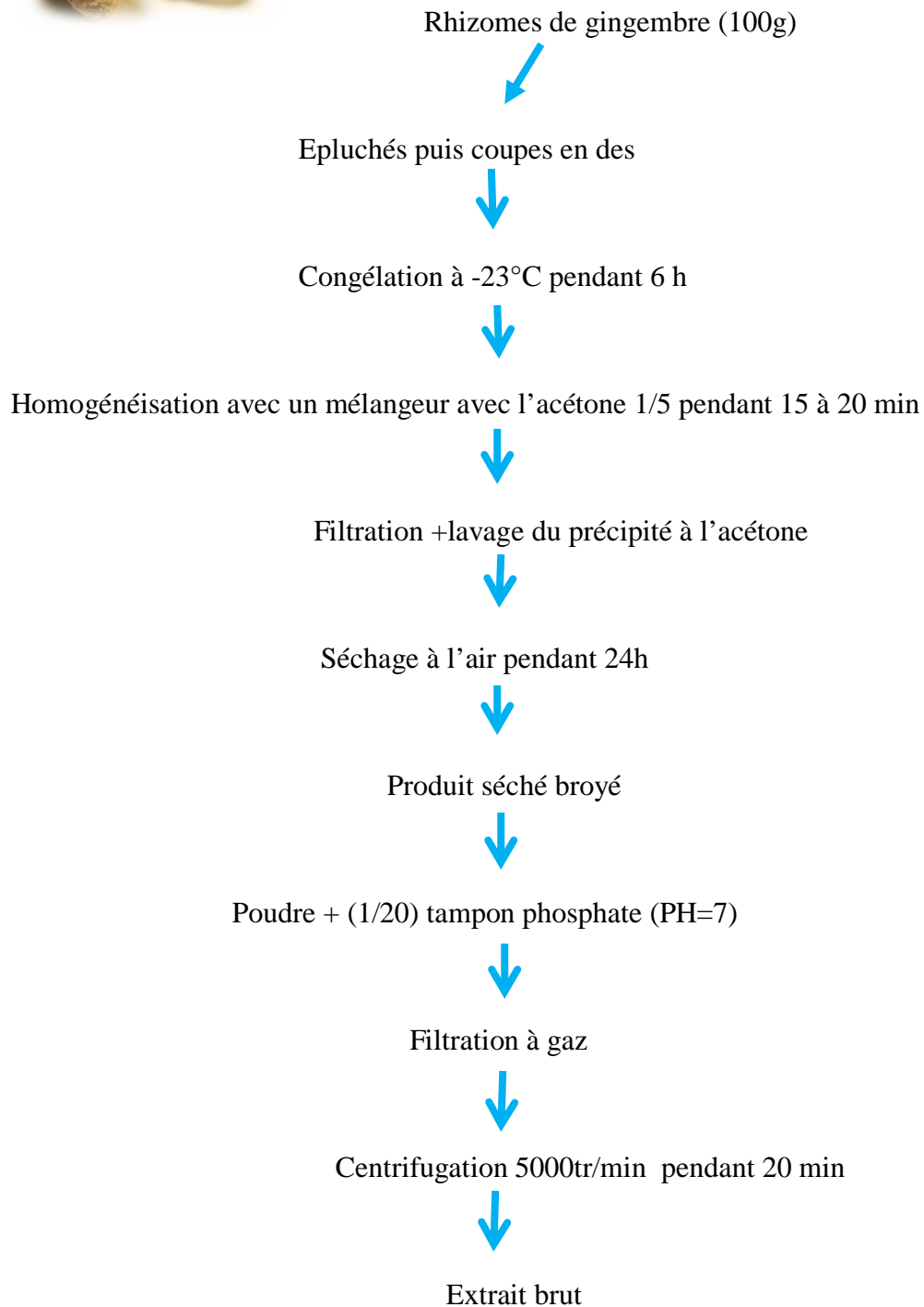


Fig.VI.8.Diagramme d'obtention de l'extrait enzymatique brute de rhizomes de gingembre.(MalikHashimet al.,2011).

VI.4.1. Contrôle physico-chimique**VI.4.1.1. Détermination du taux de protéine totaux**

Le taux de protéine totaux de l'extrait enzymatique est déterminé par la méthode de BRADFORD (Bradford, 1976).

Principe

Le principe de cette méthode est basé sur la coloration des protéines de la solution par le bleu de coomassie G-250. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéine dans le milieu. C'est une méthode très sensible détectant des teneurs en protéines inférieures à 10g/ml. L'intensité de la coloration est mesurée à 595 nm au spectrophotomètre.

La concentration en protéine est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisé avec le sérum albumine bovin (BSA), (Annexe 2).



Fig. VI.9. Spectrophotomètre.

VI.4.1.2. Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante d'un extrait enzymatique est exprimée soit par l'unité d'activité coagulante (U.A.C) nommée aussi unité présure (U.P) selon la méthode de *Berridge* (Siboukeur, 2005) ou par la notion de force coagulante (Nouani *et al.*, 2009).

Les deux méthodes se basent sur la mesure du temps de floculation, qui consiste à l'intervalle de temps compris entre le moment de l'emprésurage et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu. (Alais, 1984).

L'unité d'activité coagulante est définie comme étant la quantité d'enzyme par millilitre d'extrait enzymatique qui provoque la floculation de 10ml de substrat de *Berridge* en 100 s à 35°C.



Fig.VI.10. Bain marie à 35°C.

Elle est calculée par la formule

$$U.A.C = \frac{100V}{10T.V'}$$

Ou

V : Volume du lait à coaguler (10ml).

V' : Volume de la solution enzymatique (1ml).

T : Temps de floculation en seconds.

100 : 100 seconds.

La force coagulante représente le volume du lait coagulable par unité de volume d'une enzyme ou d'un extrait enzymatique, en 40 min à 35°C et pH égale à 6,4. (Alais, 1984).

Elle est exprimée selon la formule

$$F = \frac{2400V}{TV'}$$

Ou

F : Force de l'enzyme.

2400 :40 min.

Mode opératoire

Le temps de coagulation est mesuré à l'aide d'un chronomètre qui est déclenché lors de l'ajout de 1ml de la solution enzymatique à 10ml du substrat de *Berridge* contenu dans un tube à essai et maintenu au bain marie à 35°C .le chronomètre est arrêté dès l'apparition des premiers flocons sur la paroi du tube à essai.

VI.4.1.3. Détermination des conditions optimales de coagulation

Pour mieux caractériser l'extrait du gingembre, nous avons déterminé les conditions optimales de l'activité coagulante, en faisant varier les paramètres suivants : le pH la température et la concentration en CaCl₂ du lait.

L'activité coagulante est exprimée en U.P et mesurée selon les conditions standards (T° :35°C ; pH : 6.4 ; CaCl₂ :0.01M).

VI.4.1.3.1.Détermination de la température optimale d'activité coagulante

La température optimale de coagulation du lait par l'extrait enzymatique coagulant a été déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait porté à des températures variables (30 à 65°C) (**Matoub,2000**),en fixant la température aux valeur suivantes:30 ;35 ;40 ;45 ;50 ;55 ;60 ;65.

La valeur de chaque activité coagulante correspond à la moyenne de trois essais.

Mode opératoire

Un volume de 10 ml de lait est versé dans un tube à essai et porté à 35 °C dans un bain marie. Au temps zéro 1ml de la solution enzymatique est ajouté et le chronomètre est déclenché.

Temps de coagulation est relevé visuellement dès l'apparition des premiers flocons sur la paroi du tube à essai.

L'activité coagulante est mesurée pour chaque valeur de T°(en UAC/ml).La valeur de chaque activité coagulante correspond à la moyenne de trois essais.

VI.4.1.3.2.Détermination le pH optimale d'activité coagulante

L'effet du pH du lait sur l'activité coagulante (substrat de *Berridge*) on ajustant aux valeurs de l'intervalle 5,8 à 7,2.(**Green et al., 1987**) Le pH est ajusté par addition d'une solution d'HCL ou de NaOH à 0,1N. Le choix de cet intervalle de pH est basé sur le fait qu'à des valeurs de pH inférieur à 5,5 la coagulation peut devenir une coagulation acide.

L'augmentation du pH à des valeurs supérieures à 7,0 peut provoquer l'inactivation de la protéaseemployée.

La température d'incubation est fixée à 35°C. La valeur de chaque activité coagulante correspond à la moyenne de trois essais.

VI.4.1.3.3.Détermination la concentration de CaCl₂ sur l'activité coagulante

La concentration de CaCl₂ optimal de coagulation du lait par l'extrait enzymatique coagulant a été déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait porté à dans les concentrations différentes entre 0,01 à0,08 et la température d'incubation est fixée à 35°C, et le pH de lait à 6,4.

VI.4.1.4. Rendement en protéines brutes

Le rendement en protéines totales des extraits bruts 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. (Mesloub et Hafsoui., 2012).

$$Re = \frac{MpE}{MmP} \times 100$$

MpE : Masse protéines de l'extrait enzymatique brut.

MmP : Masse de la matière utile employée (culot 50%).

VI.5. Méthode de purification

VI.5.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium a été faite selon la méthode de *Harris et Angal*(1989). L'addition du sulfate d'ammonium à une solution protéique provoque une déshydratation et précipitation des protéines (macromolécules), induisant ainsi le phénomène de relargage.

On utilise préférentiellement le sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) en raison de son faible cout, de son pouvoir précipitant élevé, de sa grand solubilité et de son faible effet dénaturant vis-à-vis des protéines (**Harris et Angal., 1989**).

Le sulfate d'ammonium est utilisé à trois concentration 25 ; 50 et 75% de saturation, sous agitation modérée. A 10ml de l'extrait enzymatique, on joute progressivement 1,36 ; 1,48 et 1,61g de sulfate d'ammonium, cette quantité calculée à partir d'un tableau spécifique d'ammonium (Annexe 3). On maintient le mélange est centrifugé à 3500 tr /min pendant 15 min après récupération la protéase et à éliminer le maximum des composants indésirables tels que les Glucides et les polyphénols. Les polyphénols présents en grande quantité dans les extraits végétaux coagulants sont fréquemment éliminés par le sulfate d'ammonium. (**Raposo et Domingos., 2008**).

VI.5.2. Rendement de pré-purification

Rendement de pré-purification est le rapport de l'activité enzymatique des extraits enzymatique pré-purifiée par rapport à l'activité des extraits enzymatiques bruts, exprimé en pourcentage selon la formule suivant (Mesloub et Hafsoui., 2012).

$$Re = \frac{Fp}{Fb} \times 100$$

Fp : Force coagulante de l'extrait pré-purifié.

Fb : Force coagulante de l'extrait brut.

VI.6. Essai de fabrication de fromage à pâte fraîche « petit suisse »**VI.6.1. Préparation de lait**

Le lait cru de vache est transformé en caillé par l'addition de la présure d'une part pour le premier essai et par l'enzyme brut pour le deuxième essai d'autre part.

Le lait a une acidité de 16°D, il va subir une pasteurisation à température de 90°C pendant 20 sec et refroidi par la suite à 25°C à 28°C.

VI.6.2. Emprésurage

la coagulation est réalisée par l'ensemencement d'une culture mixte de 1 g de levains mésophiles additionnée de 10 ml de l'extrait enzymatique brut ou 1 g de levains mésophiles additionné de 3 mg de présure puis fermentation pour une durée 12 à 14 h .C'est l'opération la plus importante dans la fabrication de fromage, elle correspond à une déstabilisation micellaire originale du lait.

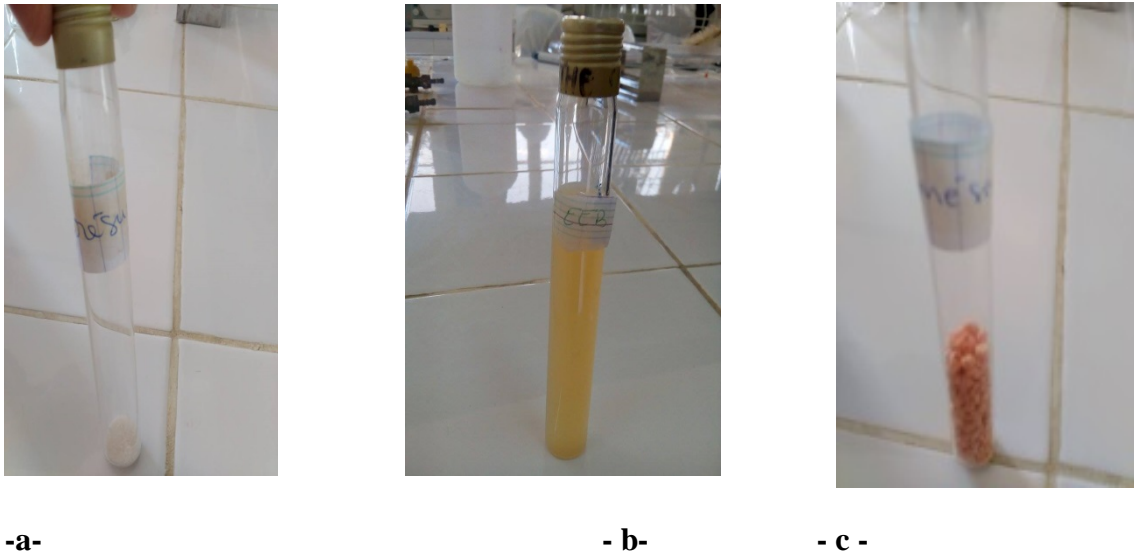


Fig.VI.11. Les différentes enzymes coagulant ; **a** :Présure ; **b** : Extrait enzymatique brute ;
c :Levains mésophile

VI.6.3.Découpage

Lorsque son acidité atteint 75 à 80°D, le caillé sera brassé pendant 10 à 15 min, puis subira une thermisation à 63°C pendant 6min.

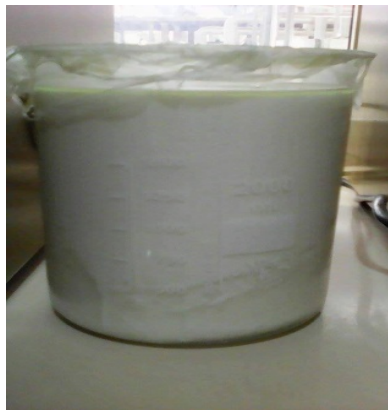


Fig. VI.12.Fermentation de lait.

VI.6.4.Séparation

C'est une opération qui complète la coagulation, elle a pour but la séparation de la phase solide (caillé) de la phase aqueuse.

Le rôle de séparation ne se limite pas à amener le coagulum à une teneur définie en eau, elle permet aussi de régler sa minéralisation.

Une fois cette opération est déterminée le caillé brassée subi une séparation en sérum et en caillé, ce dernier passe dans un refroidisseur de 4 à 6°C.

Le caillé refroidi et réengraissé avec la crème fraîche à raison de 40 g/l de matière grasse par litres.



Fig VI.13.Séparation de lactosérum.**Fig VI.14.** La pâte fraîche.



Fig. VI.15.La crème fraîche.



Fig. VI.16.Fromage frais.

VI.7. Contrôle physico-chimique

VI.7.1. Lait

VI.7.1.1. Détermination de l'acidité

Titration de l'acidité par une solution de soude en présence de phénolphtaléine.

Mode opératoire

Prendre (10ml) de l'échantillon à analyser, ajouter quelque goutte de phénolphtaléine, faire le titrage avec la soude à (N/9), attendre l'apparition d'une couleur rose claire puis lire la chute de burette (V).

$$A^{\circ} = V \times 10 \text{ (AFNOR, 1981).}$$

Avec :

A° = acidité par degré du Dornic.



Fig. VI.17. Titration de lait.

VI.7.1.2.Détermination du pH

On Pesé 10g de fromage à pâte fraîche et on ajoute 10ml d'eau distillée, ensuite on mélange et on plonge l'électrode du pH mètre dans la solution après on fait la lecture directe à 20°C avec une agitation de la solution.

VI.7.1.3.Détermination de l'extrait sec total (EST)

On Introduit une prise de 5ml de lait puis étuvage à 105°C jusqu'à l'évaporation complète de l'eau .puis on pesé le résidu.

VI.7.1.4.Détermination de l'extrait sec dégraissé (ESD)

C'est l'extrait sec non gras, il est calculé par la formule suivante

$$ESD = EST - MG$$

EST : Extrait sec totales (g /L).

MG : Matière grasse (g /L).

VI.7.1.5.Détermination de la matière grasse

Elle se déterminée par la méthode acide butyrométrique de VANGULIK 14 attaque des protéines par l'acide sulfurique et la séparation par centrifugation en présence d'alcool iso-amylque de la matière grasse libérée.



Fig.VI.18.Matière grasse par lebutyromètre.

VI.7.2.Fromage

VI.7.2.1. Détermination du pH

Le même principe et même mode opératoire que de lait.

VI.7.2.2. Détermination de l'acidité

Le même principe et même mode opératoire que de lait.

VI.7.2.3. Détermination de l'extrait sec total (EST)

Le même principe et même mode opératoire que de fromage.

VI.7.2.4.Détermination de l'extrait sec dégraissé(ESD)

Le même principe et même mode opératoire que le lait

VI.8.Contrôle microbiologique

L'objectif de ces analyses est de déterminer l'évolution de la flore des contaminations suivantes

- ❖ Germes aérobies mésophiles totaux.
- ❖ Coliformes totaux/fécaux.
- ❖ Clostridium S/R.
- ❖ Salmonelles.
- ❖ Staphylococcus aureus.
- ❖ Levure et moisissures.

(Voir l'annexe N°5)

Chapitre VII



Résultats et Discussion

VII.1.Résultats physico-chimiques

VII.1.1.Rhizomes de gingembre

L'analyse physico-chimique du rhizome de gingembre utilisé comme source d'obtention de l'extrait coagulant du lait est basé essentiellement sur la détermination de la matière sèche et le taux d'humidité.

Tableau VII.1.Résultats des analyses physico-chimique de gingembre.

Constituants	Teneur moyennes (MS%)
Extrait sec	36.86
Humidité	63,14

Les résultats d'analyse physico-chimique liés par certains facteurs tel que la matière première qui influe sur la composition du rhizome de gingembre à savoir les conditions pédoclimatiques et la nature de sol, le stade floraison et la saison, Ces paramètres peuvent différés d'une région à une autre.

VII.1.2.Extrait enzymatique brut

VII.1.2.1.Caractérisation de l'extrait enzymatique brut de gingembre

La quantité moyenne de rhizomes de gingembre qui peut être récupérée varie selon les dimensions des rhizomes.et la quantité d'extrait brut dépend à l'efficacité d'extraction (pH des solutions,la quantité, la concentration) et à la finesse de l'échantillon à extrait. (fig.VII.1).

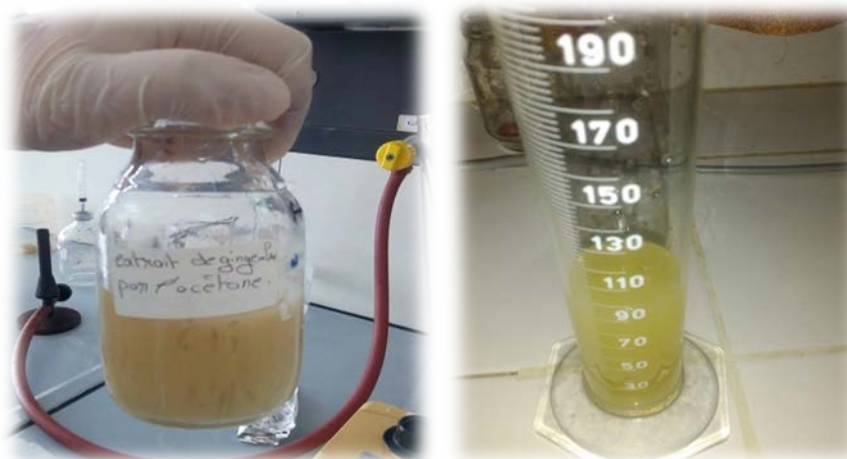


Fig.VII.1.Extrait enzymatique de rhizomes de gingembre.

Tableau VII.2.Caractéristiques de l'extrait enzymatique brut obtenu à partir de 100g de gingembre.

Caractéristiques de l'extrait brut	Valeurs
pH	6,65
Volume de l'extrait récupéré (ml)	94,9
Temps de coagulation (seconde)	17
Taux de protéines (mg/ml)	77,5
UAC(U.P)	5,88
Force coagulante	1/1411,76

Discussion

L'extrait enzymatique brut de gingembre est caractérisé par un pH égale à 6,65 ce qui indique que l'enzyme est actif dans un milieu neutre, avec un volume récupéré de 94,9 ml de couleur jaune foncé et un taux de protéine est de 77,5(mg/ml).

✚ Temps de coagulation

Le temps de coagulation (les premières flocons) du 10 ml de lait par 1 ml d'extrait enzymatique brut est 17 seconde c'est-à-dire notre extrait est bon qualité (riche en protéases).

✚ L'activité coagulante

L'activité coagulante est de 5.88 UP pour 1 ml d'extrait brut, est une activité inférieure à celle mentionnée par (Malik et al. 2011). Qui a obtenu un extrait de gingembre ayant une activité 146.9 unité /mg.

✚ La force coagulante

La force coagulante que nous avons obtenue peut coaguler 1411.76ml de lait par 1 ml de l'extrait brut de gingembre.

VII.1.2.2. Détermination des conditions optimales de coagulation

Dans le but de déterminer les conditions physico-chimiques optimales pour l'action de l'extrait de gingembre. Nous avons étudié l'influence de certains paramètres sur son activité coagulante par comparaison à celle de la présure.

VII.1.2.2.1. Influence de température sur l'activité coagulante

L'influence de température du lait sur l'activité coagulante de l'enzyme a été étudiée dans l'intervalle de température de 30°C à 65°C. La (fig. VII.2) montre l'effet de la température du lait sur l'activité de l'extrait de gingembre et celle de la présure.

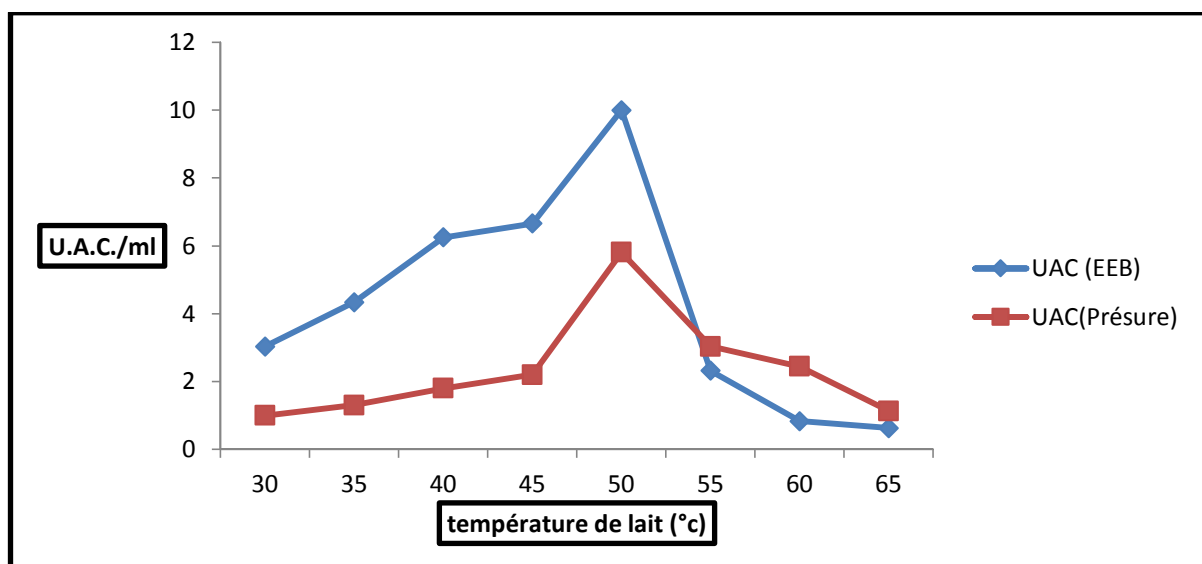


Fig.VII.2.Effet de température du lait sur l'activité coagulante du l'extrait enzymatique.

Discussion

Les résultats rapportés dans la (Fig. VII.2) indiquent que l'activité coagulante de l'extrait enzymatique et de la présure augmente proportionnellement avec l'élévation de température jusqu'à 50°C, puis l'activité diminue au-delà de 55°C (dénaturation des protéines).

Dans une étude similaire, **Poza et al. , (2003)**, ont observé une température optimale à 37°C pour la protéase de *Myxococcus xanthus*. Dans un autre travail, **Adoui (2007)** a rapporté que la température optimale d'activité coagulante pour la pepsine du poulet est de 55°C et elle mentionné également qu'aux températures de lait dépassant 65°C la pepsine est inactive.

Les enzymes d'origine végétale, bien que thermophiles, peuvent perdre leur activité dans le temps. Cette variation de l'activité enzymatique en fonction de la température et de temps pourrait être un facteur limitant pour une application en technologie alimentaire. (**Nouani et al., 2009**).

Selon **Kawaguchi et al. ,(1987)**, la température optimale de l'activité coagulante pour la pepsine du poulet est de 55°C et à la température de lait dépassent 65°C la pepsine est inactive.

VII.1.2.2. Influence de pH sur l'activité coagulante

Le pH du lait (substrat de *Berridge*) est ajusté dans l'intervalle 5,8-7,2.

Influence de pH du lait sur l'activité coagulante de l'enzyme est illustrée dans la (Fig. VII.3)

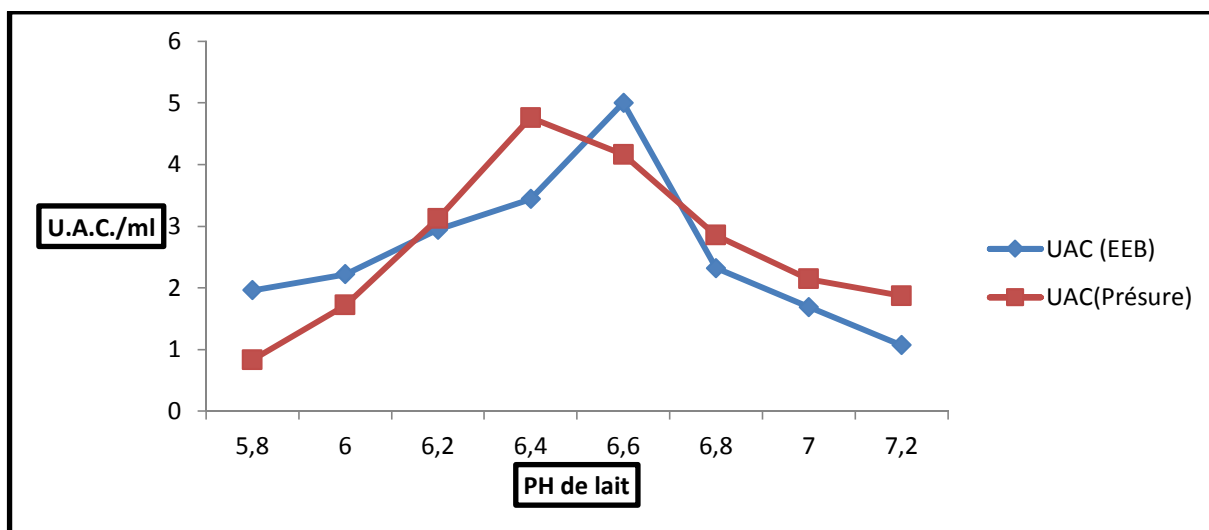


Fig. VII.3. Effet de pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique.

Discussion

Les résultats rapportés dans la (Fig.VII.3). Indiquent que l'activité coagulante augmente avec l'élévation de pH pour atteindre une valeur maximale 6.4 et 6.6 pour la présure et l'extrait enzymatique brut respectivement, puis une inactivation totale au pH7.

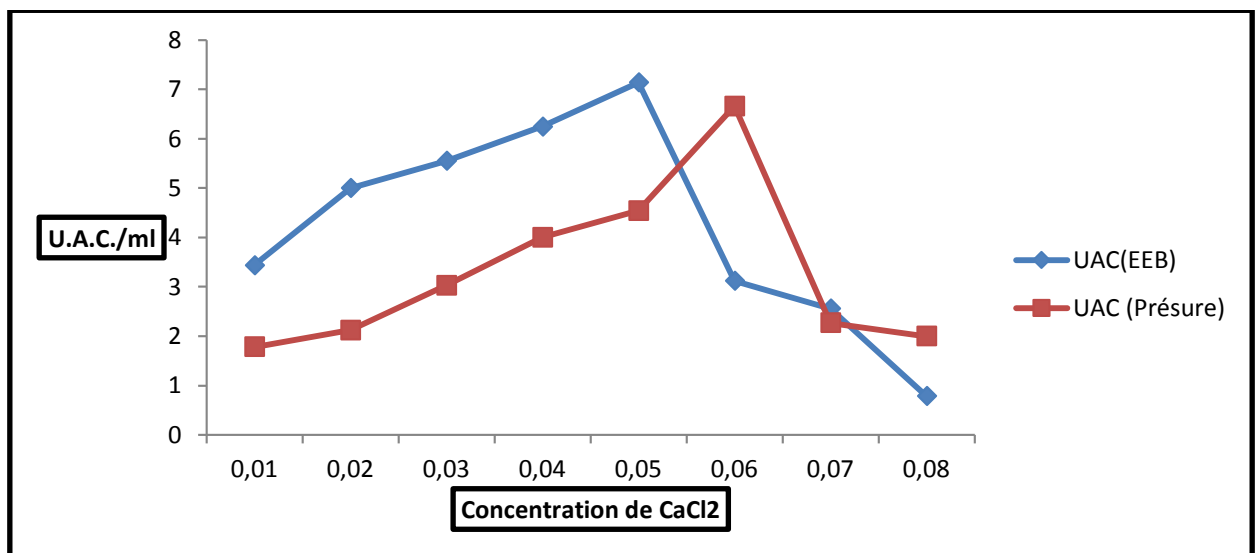
Les enzymes des plantes sont connus pour être actives soit en milieu acide(Chazarraetal., 2007).Soit en milieu basique(Raposo et Domingos, 2008).

Selon Horne et Banks, (2004).Le pH optimal de l'activité coagulante pour la pepsine est entre 6,3-6,6, donc elle est similaire à celle de l'extrait de gingembre.

VII.1.2.2.3. Influence de concentration de CaCl_2 sur l'activité coagulante

L'addition du chlorure de calcium au lait, pratique courante en fromagerie, a pour effet de réduire le temps de coagulation et accroître la fermeté de coagulum (Il joue le rôle de ciment dans polymérisation des caséines par la formation de ponts calciques)

La (Fig. VII.4) montre l'influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante de l'extrait de gingembre et celle de la présure.



FigVII.4.Effet de CaCl_2 sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique.

Discussion

Les résultats de la (Fig.VII.4) montrent que l'activité coagulante augmente avec la concentration de CaCl_2 .elle atteint un maximum de 0,05M et 0,06M pour l'extrait enzymatique brut et de présure animale respectivement. Pour les concentrations supérieures, l'activité baisse

par un effet inhibiteur de l'ion calcium. Ceci s'explique par l'inhibition des caséines du lait (Cheftel et al., 1985). Par ailleurs Morsli (1996), a obtenu une valeur de 0.01M pour la présure.

Selon Vairo-Cavalli et al., (2005). L'activité coagulante de CaCl_2 est 0,03M, ce qui indique que la concentration en CaCl_2 du chardon marie (*Sylbiummarianum*) plus active que l'EEB.

VII.1.2.3. Taux de protéine totale

Tableau VII.3. Concentration en protéine totales de l'extrait enzymatique brut.

	L'extrait coagulant brut	L'extrait coagulant purifié(50%) de saturation en sulfate d'ammonium
Concentration en protéine totale(mg/ml)	77,5	89.28

Discussion

Le taux de protéines de l'extrait coagulant brut (77.5mg/ml) est inférieur à la concentration de la protéine de l'extrait coagulant purifié (89.28mg/ml).

✚ Concentration en protéines totale (mg /ml)

L'extrait coagulant brut à une composition mixte comprend des protéines enzymatique et non enzymatique. En revanche, la purification permet d'éliminer une quantité importante de protéines inactives.

Ce taux de protéines obtenu est supérieur à celui obtenu par Morsli pour l'artichaut (4.8 mg/ml) (Morsil, 1996).

VII.1.3. Méthode de purification

VII.1.3.1. Résultat de la précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium est une méthode largement utilisée dans la purification des protéines. Elle est appropriée le fractionnement des protéines et a montré son efficacité dans l'élimination de plusieurs contaminations d'extrait protéique.

Tableau VII.4.Précipitation de l'extrait enzymatique brut au sulfate d'ammonium**Test sur le surnagent**

Pourcentage de saturation de sulfate d'ammonium	25%	50%	75%
Temps coagulation de surnagent (s)	28	54	62
Activité coagulante (surnagent) (U.P/ml)	3.57	1.85	1.61
Absorbance de surnagent (bradford) (nm)	0.342	0.282	0.211

Discussion

Les résultats rapportés dans le tableau (VII.4.) montrent que le temps de coagulation augmente de 25% de taux de saturation en sulfate d'ammonium jusqu'à 75 %, ceci s'explique par la précipitation de l'enzyme.

Tableau VII.5.Précipitation de l'extrait enzymatique brut au sulfate d'ammonium**Test sur le culot**

Pourcentage de saturation de sulfate d'ammonium	25%	50%	75%
Temps coagulation de culot (s)	25	18	26
Activité coagulante (culot)	4	5.55	3.84
Absorbance de culot (bradford) (nm)	2.050	1.485	0.616

Discussion

Contrairement au tableau VII.4.relatif au test du surnagent les résultats du VII.5.montrent que le temps de coagulation diminue pour un taux de saturation en sulfate d'ammonium de 25% à 50% puis augmente à un taux de saturation 75%. Ceci s'explique par la précipitation de l'enzyme dans le culot de 50% de saturation en sulfate d'ammonium, nos résultats sont similaires a ceux obtenus par (Mekhaneg K et MekhanegS, 2014) pour *SylbiumMarianum*

VII.1.3.2. Rendement en protéines pré-purification

$$Re = \frac{Fp}{Fb} \times 100 = 86\%$$

Selon nos résultats notre rendement en protéines est supérieur à celui obtenu par (Bounekkacheet Boulefaa ,2015) qui est de 45% pour *Cynara Cardunculus*.

VII.1.4. Lait

Les résultats d'analyse physico-chimiques du lait sont représentés dans le tableau (VII.6).

Tableau VII.6. Les résultats d'analyse physico-chimique de lait utilisé pour la fabrication du fromage à pâte fraîche.

paramètre	Lait	Norme d'AFNOR(1981)
L'acidité (D°)	16	14-18
Matière sèche(EST) g/l	86.34	90
Matière grasse (g/l)	30	28
ESD (g/l)	56.34	62

l'acidité

Les résultats de ce paramètre répondent à la spécification exigée. Cette acidité est un indice de stabilité de la pâte fraîche situé dans la norme, et les valeurs de tableau (VII.6) sont conformes à la norme d'AFNOR.

VII.1.5.Fromage à pâte fraîche

Tableau VII.7.Les résultats des analyses physico-chimiques de produit fini.

Paramètre	Fromage fait avec présure	Fromage fait avec l'EEB	Norme d'AFNOR(1981)
EST (g /l)	202	189	200
ESD (g /l)	172	159	160
pH	4.6	4.6	4,5-4.6

Discussion

D'après le tableau (VII.7). Nous remarquons que tous les résultats sont conformes aux normes d'AFNOR.

VII.2.Détermination de la stabilité de l'enzyme en fonction de temps

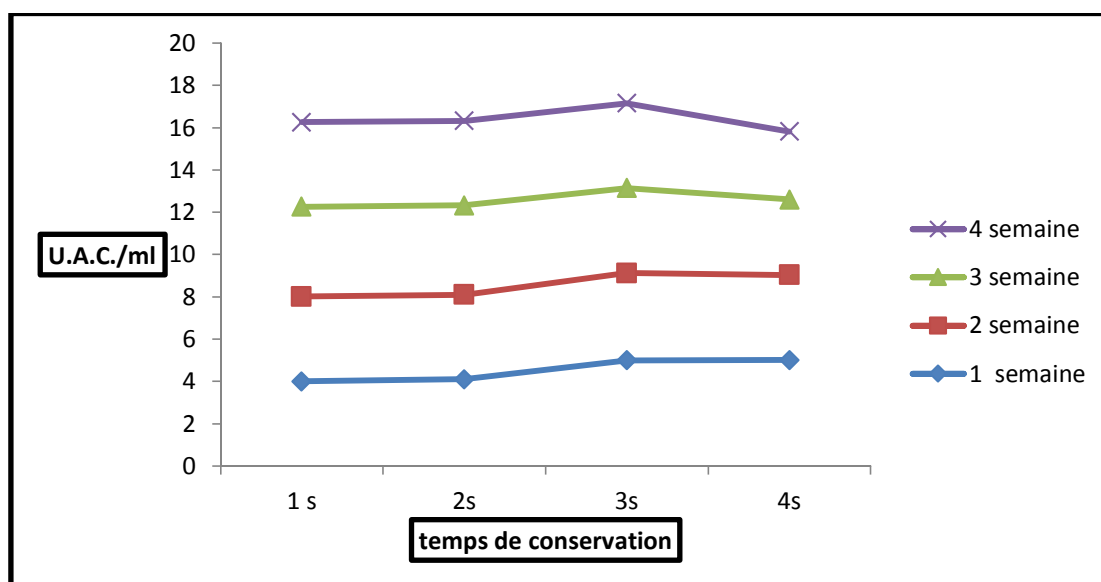


Fig. VII.5.Effet de stabilité de l'enzyme en fonction du temps.

Discussion

D'après les résultats de la Figure VII.5 nous remarquons que l'extrait brut de gingembre reste stable après les 4 semaines de conservation à température du -20°C.

VII.2. Résultats du contrôle microbiologiques

Fromage à pâte fraîche

Tableau VII.8. Résultats des analyses microbiologique de fromage à pâte fraîche.

Paramètre	Fromage fait avec présure	Fromage avec L'EEB	Norme
Coliformes totaux	0	0	100
Coliformes fécaux	0	0	10
Streptocoque Fécaux	Abs	Abs	Abs
Clostridium S/R	0	0	0
Salmonelles	Abs	Abs	Abs
Staphylococcus Aureus	0	0	0
Leveurs	0	0	0
Moisissures	0	0	0

Discussion

D'après les analyses microbiologiques effectuées sur le produit fini (pâte fraîche) soit à base de présure ou à base d'EEB mentionné dans le tableau (VII.8), on révèle une absence totale des germes pathogènes recherchés excepté des GAMT qui présentent une faible charge et qui ne dépassant pas le seuil d'acceptabilité. Ceci implique que notre fromage est conforme aux normes (AFNOR, 1981).

Conclusion

Générale

Conclusion

L'étude que nous avons réalisée a permis d'extraire et de pré-purifié l'agent coagulant de lait à partir des rhizomes de gingembre (*Zingiber Officinales*).

En effet cette étude nous a permis de déterminer l'activité coagulante, la composition protéique de l'extrait coagulant et de comparer l'activité coagulante de l'extrait brut avec celle de la présure commercial en fonction des différents paramètres (T° , pH, concentration en CaCl_2).

L'extraction de rhizome de gingembre a permis de donner à partir de 100 g, 94,9ml d'extrait enzymatique brut, et un temps de coagulation de 17 sec avec une activité coagulante de 5,88 U.A.C/ml.

En outre, nos résultats montrent que les conditions optimales d'activité de l'enzyme sont déterminées (pH 6, 6, à une température de 50° et à une concentration de CaCl_2 de 0.05M).

La pré-purification de notre extrait enzymatique par le sulfate d'ammonium a montré que l'enzyme est purifié à un taux de saturation en sulfate d'ammonium à 50%.

Pour compléter cette étude nous avons jugé nécessaire d'effectuer un essai de fabrication d'un fromage type pâte fraîche « petit suisse ».

Les analyses physico-chimiques et microbiologiques du produit fini, montrent que les fromages fait à base d'extrait coagulant brut de rhizomes de gingembre ne présentent pas de différence de qualité organoleptiques (texture plus compacte et une faible quantité de lactosérum) par rapport à celle de la présure.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait coagulant obtenu des rhizomes de gingembres peut constituer une alternative à la présure commerciale pour la fabrication de fromage.

Comme perspectives, notre enzyme doit subir une purification totale par des techniques de chromatographie basse pression (FPLC) (Fast Phase Liquide Chromatographie) et l'électrophorèse sur gel SDS. (Sodium Dodécyl Sulfates).

Références

Bibliographiques

Les références bibliographiques

ADOUI F., (2007). Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir du proventricules de poulet. Mémoire magister. Univ. Mentouri Constantine. 64p.

AFNOR,(1981).Lait et produit literie, méthodes d'analyses, recueil des normes française Ed, AFNOR-paris.

Agboola S., (2002). Cheesemaking from ultra-filtered milk using plant rennet. *The Australian Journal of DairyTechnology.* 57, p.143.

Alais,C et Blanc . B., (1975). « Milk proteins: biochemical and biological aspects. WLD ». Vol 20 : P66-71.

Alais C., (1984). Science du lait : Principes des techniques laitières (Société d'édition et de promotion agro-alimentaires, industrielles et commerciales

Alais C., and Linden G., 1997. Abrégé de biochimie alimentaire (Masson).

Amiot, J ;Fourier,S ;Lebeuf,Y. ;Paquin, P. et Simpson,R.,(2002). Composition propriété physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. IN : Science et technologie du lait – Transformation du lait, presse International, polytechnique, canada.

Apfelbaum etal., (2004).Dictionnaire pratique de diététique et de nutrition.

Aurélien Voisin (2010).thèse de doctorat, université Paut-sabatier de Toulouse « Influence du type d'alimentation sur la texture et la flaveur du fromage ».

Banga-Mboko H., Godeau J.M., Drion P.V., El Amiri B., Drion V., Perenyi Z., Sousa N.M., Et Beckers J.F., (2002). Évaluation de l'utilisation du pepsinogène sanguin comme bio marqueur de l'intégrité de la muqueuse gastrique. Chez le porc –Historique, physiologie des muqueux gastriques et différents formes de pepsinogènes.

Beldarrain A., Acosta N., Montesions R., Mata M et Cremata J., (2000). Characterization of *Mucorpusillusrennin* expressed in *Pichra pastoris*: enzymic, spectroscopie and calorimetric, studies. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31, 77-84.

- Belew M. A., Olatunde O. A. and Giwa T. A., December, (2009).** « Underutilized medicinal Plants and spices: Chemical composition and phytochemical properties », *Journal of Medicinal Plants Research* Vol 3(12), pp 1099-1103
- Belitz H.-D., Grosch W. and Schieberle P. (2009).** *Food chemistry*. 4ème Ed Springer Verlag Berlin, P.1070
- Bonfoh B., Zinsstag J., Farah Z., Simbé C.F., Alfaroukh I.O., Aebi R., Badertscher R., Collomb M., Meyer J., Rehberger B., (2005).** Raw milk composition of Malian zebu cows (*Bos indicus*) raised under traditional system. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 29-38.
- Benyahia R., (2013)** . *Technologie du lait. Constitution, récolte, traitement et transformation du lait.*, Paris, 714 p.
- Borget M., (1991).** « Les plantes tropicales à épices », MAISONNEUVE & LAROSE. PARIS,
- Boudier et Luquet, (1981).** *Dictionnaire laitier . Technique et documentation Lavoisier.* Paris
- Bounekkache, F., Boulefa , I (2015),** Extraction et purification d'une protéase coagulant le lait extraite à partir du *Cynara Cardunculus* , p59 .
- Boularab, A., (2005).** *Guide des de terminations et controle de lait et produits laitiers.* Direction générale du contrôle économique et de la répression des Fraudes.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J., (1996).** « Microbiologie alimentaire ». Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Edition Lavoisier, paris.
- Boyaval, P., Corre, C., et Roussel , F., (1995).** « Effect of free fatty acid on propionic acid bacteria. Le lait ». Vol:75. p 17-29.
- Bradford M.M (1976).** “A rapid and sensitive method for the quantites of protien utilizing the principal of protien dye biding” *Analyt Biochem.* Vol:72. P248-254.
- Broome M.C., et Hickey M.W. (1990).** Comparison of fermentation produced chymosin and calf rennet in cheddar cheese. *Australian J. Dairy. Technology.*, 45, , 53-59.
- Brule, G., Lenoir, J., et Remeuf, F., 1997.** La micelle de caséine et la coagulation du lait in: *Le Fromage*. Ed., A. Eck, 3ème Ed., Technique Et Documentation Lavoisier, Paris, P.741,891p.
- Carole., L., Vignola (2002).** « Science et technologie du lait : transformation du lait, fondation de technologie » Edition Tec 8 Doc, 1, 12, 14, 15p.
- Cathrene , Foucaud, S., (2005).** *La fabrication du fromage . Les connaissances,* INRA. Paris .
- Cayot P, Lorient D., (1998).** « Structure et techno fonction des protéines du lait. Technique et documentation. Lavoisier », Paris, 363 p.

Chazarra S. Sidrach11. Loopez – Molina D., et Neptuno Rodriguez- Loopez N., (2007). Characterization of milk – clotting properties of extracts from artichoke (*Cyanara Scolymus, L*) flowers. *International Dairy Journal* 17: 1393-1400 PP.

Cheftel J .C., Cup J.L., Lorient D., (1985). « Protéines alimentaires. biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, modifications chimiques. Technique et documentation Lavoisier, » Paris, p38.

Choi, K.H., Laursen, R.A., and Allen, K.N.(1999). « The 2.1 angstrom structure of acyl-peptidase with proline specificity from ginger rhizome, *Zingiber officinale*. *Biochemistry* ».; 38.: 11624–11633.

Cogitore A., (1982). Traité pratique de réglementation laitière, laits et produits laitiers (Antoine Cogitore).

Collection FAO (1998). « Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine », Volume 28, Alimentation et Nutrition. Ed Food & Agriculture Organisation., P.271.

Debry, G (2001). "Lait, nutrition et santé", Edition Tec & Doc Lavoisier, Paris,

Debry, G ;2011. « Lait, nutrition et santé » Edition Tec et Doc Lavoisier, Paris.

ECK (1987). Le fromage, Ed : TEC et DOC , Lavoisier .

Eigelw, Butler JE, Erustom(1984). « Nomenclature of protéines of milk. Fifth revision. *J. Dairy Sci.*, 67 :1599-1631 ».

Devillient W.P ., Kobayashi H., et Kusakabe I., 1983. Purification and characterization of milk clotting- enzymes from *Bacillus sp* 2956 . *Bio. Agri. Biochem.* 59.9.2343-2349.

El-Bendary M. A., Moharam Maysa E. and Ali Thanaa H. (2007). Purification and characterization of milk-clotting enzyme production by *Bacillus sphaericus*. *Journal of Applied Sciences Research*, 3 (8): 695-699

FAO, (2002). Lait et produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO/Alimentation et nutrition .28,7 p.

FAO, (2008). Les statistiques de l'organisation des additifs alimentaires FAOSTAT/[http://Faostat-fao.org/site/339/de_faut.aspx](http://faostat-fao.org/site/339/de_faut.aspx).

(FAO) Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture et (SAGE) Service D'Appui à la Gestion de l'Environnement Fampanandroana Maharitra, (2005).

« Guide technique pour l'exploitation du Gingembre »,

Férial AzizoBenyahiaéq-Kridthése de doctorat-université Constantine 1,**2013** « Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vue d'une valorisation des pro ventricules de volailles au profit de la filière lait en Algérie ».

Finc.(1973). Produits de remplacement de la présure de veau. Document, vol 74,p.p .24-36.

Fox Patrick F., McSweeney Paul H. K., Cogan T. M. and Guinee T. P. (2004). Cheese: chemistry, physics and microbiology: general aspects Volume 1. 3ème Ed Elsevier Academic Press, London, P. 640

Fox P. F., (1987). Cheese: chemistry, physic and Microbiology edition, Volumes 1 and 2, Elsevier, London.

Franchomme P. et Docteur Penoël D.,(1995).« L'aromathérapie exactement »,RogerJollois, Limoges,

Gelais et Tirard Collet ST. (2009) .Fromage : Science et tecknologie du lait transformation du lait .ED/ISBN. Canada. P 345.

Germain Beka Robert (2011). « une alternative végétale en fromagerie :préparation d'un extrait coagulant à partir des fruite de balanites ,étude biochimique et application technologique thèse de doctorat universityLillel en France.

Goursaud J., (1993).Coagulation enzymatique du lait In : Scriban R.(cood).Biotechnologie. Ed.Tec et Doc. Lavoisier, Paris, 4ème éd, pp393-405.

Graiday P., (1978). Détermination de l'activité enzymatique d'extraits coagulants d'origine animale. *Revue du Technicien du lait*, 83 : p.p. 5-47.

Green M. L. et Stackpoole A., (1987). The Preparation And Assesment of A Suitable *MucorPusillus*Lindt Proteinase- Swine Pepsine Mixture For Cheddar Cheese-making.*J. of Dairy Res.* 42:297-312.

Harris E.L. V., Angal S., (1989).Protein purification methods.A practical approach IRL Press at Oxford University Press. U. K. p156

Horne, D.S. and Banks, J.M,(2004).Rennet-induced coagulation of milk. in: .Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 1. 3rd rev. ed. Chapman and Hall, London, UK ; 2004.: 47-70

Jarmul I., Reps A., Poznanski S. etZelazowska H., 1982. Utilisation du mélange de la pepsine avec la préparation microbienne «Fromase» dans La fabrication des Fromages EDAM et Kortowski. *Le Lait*, 62, 75 – 86.

Joyeaux A., (1982). Les préparations industrielles d'enzymes In : les enzymes ; production et utilisation industrielles, 3ème trimestre, 352p.

Julliard,V,Richard,T (1996) « le lait » p 24-26.

Kawaguchi, Y., Kosugi, S., Sasaki, K., Uozumi, T., and Beppu, T(1987). Production of chymosin in *Escherichia coli* cells and its enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.* 51: 1871–1877

Khalid,M.;Sharmmet,R.J. ;Brown, J et Mcmahon,D.,(1992).Proteolyte activity of some milk-clotting enzymes on caséine.*J.Dairy.Sci.*Vol :75.p1373-1378.

Kurmann J.,Rasic. 1978. « Yaghurt, scientific grounds,technology,manufacture and preparation » Ed Technical Dairy Publishing House Denmark.431 P,

Kim, M., Hamilton, S.E., Guddat, L.W., and Overall, C.M.(2007); Plant collagenase: Unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770: 1627–1635

Lenoir J., 1985. Les caséines du lait. *Rev lait franç*, 440 : 17-23

Lenoir J, Lamberet G, Schmidt J.L. et Tourneur C., (1985). La maîtrise du biocatalyseur fromage. *Biofutur.*, (12). 23-50.

Libouga D. G., JiwouaNgounou C. N., Kouebou C. P., (2013).Etude du lait de zébu (*Bos indicus*) obtenu à Ngaoundéré (Adamaoua, Nord Cameroun). *Cameroon Journal of Academic Science*, 1, 14-19.

Linden & Lorient, (1994). Biochimie agro-alimentaire : Valorisation alimentaire de la production agricole. Ed. Masson. Paris. Milan. Barcelon. P 141-163.

Luquet (1987) lait et produit laitiers, vache, chèvre, 2^{ème} édition.

Mahaut M., Jeantet R. et Brulé G., (2003). Initiation à la technologie fromagère. Paris, Lavoisier, Technique Et Documentation, Lavoisier, France ; Pp 24-102.

Mahaut .,RJeantel., et G Brule(2002) « Initiation à la tecknologie fromagère » . Techniques et documentation,

Maistre j.,(1964).« les plantes à épices », G.-P. MAISONNEUVE & LAROSE, PARIS(Ve),.

Malik Muhammad Hashim b, Dong Mingsheng ., (2011). Muhammad Farooq Iqbal c, Chen Xiaohong *Phytochemistry* 2011, Pages 458–464

Marcel et mazyoyer, (2007) .Milk clotting protease : structure, fonction ;Milk ; Dair, Vol :35,P223-231

Martin ,B et Coulon,J.B.,(1995).milk production and cheessecharacteristics .1 :infulence of milkproduction condition on herdmilkclottingability .le lait N°1.vol :75 p 61-68.

Mathieu J., (1998). Initiation à la physicochimie du lait, technique et documentation Lavoisier Paris pp 12-199.

Matoub L., (2000). Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33). Mémoire de Magister. Sciences alimentaires. I.N.A. El-Harrach.

Mekhneg ,M. Mekhneg ,S (2014) ; Purification et caractérisation d'une protéase extraite à partir du chardon marie (*Silybum marianum*) P.58.

Mohamed Ahmed I. A., Babiker E. E. and 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 - Food Science and Technology*, 43: 759-764.

Mohanty A.K., Mukhopadhyay U.K., Kaushik J.K., Grover S., Batish V.K., (2003). Isolation, Purification and Characterization of Chymosin from Riverine Buffalo (*Bubalububalis*). *J. Dairy Res.* 70: 37–43.

Morsli A .(1996) “Recherche sur les activités protéiniques d'extrait de cynara à scolymus, du latex de ficus carica et du proventricule de Gallus gallus en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Thèse de Magister . INA ,P181.

Munoz R., Garcia J.L., Carrascosa A.V. et Gonzalez R., (2004). Cloning of the authentic bovine gene encoding pepsinogen A and its expression in microbial cells. *Rev. Appl. Envir. Microb.*, 70, .5, pp 2588-2595.

Naveena, B.M., Mendiratta, S.K., and Anjaneyulu, A.S.R.(2004) Tenderization of buffalomeat using plant proteases from *Cumumistrigonus* Rosb (Kachri) and *Zingiber officinale* Roscoe (ginger rhizome). *Meat Sci.* 68.: 363–369

Noor-Develiet P.E., Gist-Brocades N.N. Et Delft N.C.D. 1983. Les Enzymes Alimentaires : Utilisation et Innocuité. *Microbiol. Alim. Nut.*, 1 : 15.

Nouani, A., Dako, E., Morsli, A., Belhamiche, N., Belbraouet, S., Bellal, M.M., and Dadie, A. (2009). Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynarascolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J. Food Technol.*; 1: 20–29

Pernodet (1987). Le fromage. Ed : TEC et DOC, Lavoisier et cie .

Polaina J., Maccabe A.P., (2007). Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications. Springer. Netherlands.

Poza, M.; Sieiro, C. ; Carreira, L.; Barros-Velazquez, J; Villa, T.G.,(2003). *J. Ind Biotechnol.* Vol : 30. P691-698.

Ramat J.P., Weber F., (1980). Purification à l'étude de l'influence des facteurs du milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le lait*, 60, 1-13.

Ramet, J.P.,(1997). Les agents de transformation du lait; la présure et les enzymes coagulantes In: *Le Fromage*. Ed., A. Eck, 3ème Ed., Tec Et Doc, Lavoisier, P.101-107, 539p

Ramet J.P., (1989). Le fromage, Tec et Lavoisier .Paris.

Ranaivonjoany m.,(2005). « Place du gingembre dans les systèmes de production de Beforona », Mémoire de fin d'études, Département Agriculture, Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques ESSA, Université d'Antananarivo.

Raposo S., Domingos A., (2008). Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process biochemistry*, 43, 139-144.

Roudaut, Héléne, Evelyne Lefranc., (2005). Alimentation théorique C doinéditeurs, centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine P.116.

Sathya R., Pradeep B. V., Angayarkanni J., and Palaniswamy M. (2009). Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using Agro-industrial Wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14: 788-794.

Saubuse Majorie. 2012 "Effet de barrière des populations microbiennes des laits crus vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* dans un fromage à pâte pressée non cuite" Thèse de doctorat. Université de Blaise Pascal,

Scriban R., (1999). Biotechnologie. 5e Edition. *Tech Et Doc*. Lavoisier. Paris

Shieh CJ., Phan Thi LA., Shih IL (2009). Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. *Biochem. Eng. Journal* 43:85-91.

Siboukeur O., Mati A., Hesas B., (2005). Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait camélien (*camelus dromedarius*). utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastrique de dromadaire. *Cahier d'études et de recherches francophones / Agriculture*. 14 : 473-483.

Simões I., Faro C., (2004). Structure and Function of Plant Aspartic Proteinases. *Eur. J. Biochem.* 271: 206–207.

Simon. D et Tirard- Collet .J. ,(2002) . Transformation des produits laitiers frais à la ferme.

Simpson William,T.,(1999). «Drying and control of Moisture Content and Dimensional Changes. Gen Tech. Rep. FPL-GTR-113. Madison, Forest products Laboratory. P. 463.,

Sousa M.J .,MalcataF.x.(2002) « advances in the rôle of a plant coagulant in vitro and during ripening of cheeses from several Milk »

Tamime A. (2006). Fermented Milks. Ed Blackwell Science Ltd, England, P. 262.

Vairo-Cavalli, S., Claver, S., Priolo, N., and Natalucci, C,(2005). Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *J. Dairy Res.*; 72.: 271–275

Veiss Eyre, (1975). Technologie du lait : constitution récolte, traitement et transformation du lait Ed. la maison rustique, paris ,44-558.

Vernon F. et Richard H.,Juillet(1976). « Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles », vol 2, série synthèses bibliographiques N°10, Centre de documentation internationale des industries utilisatrices de produits agricoles (C.D.I.U.P.A.),

Vetier.,Banon S., Ramet J.P., Hardy J., (2000). Hydratation des micelles de caséine et structure fractale des agrégats et des gels de lait. *Le lait*, 80,237-246.

Vierling, (2003). Aliments et boissons. Filières et produits .Doin éditeurs .Centre regional de documentation pédagogique d'Aquitaine

Vierling Elisabeth., (2008). Aliment et boissons Filières et produits 3^{ème} édition 22,23p.

Vignola . C., (2002). Science et technologie du lait : transformation du lait, fondation de technologie laitière du québec 1,12,14,15,p

Vioque M., Gomez R., Sanchez E., Mata C., Tajada L. et Fernandez-Salguero J., (2001) chemical and microbiological characteristics of Ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *cynaracardunculus* and *cynarahumilis* coagulants. *J.Agric. Food Chem.*48: 451-456.

Wigley,R.C.,(1996).chesse and whey in industrialenzymology.secondED.Godfrey and Wiest.p135-142.

Zafimahova K.A.,(2006). « Contribution à la valorisation du gingembre de Beforonacasdu séchage », mémoire de fin d'études, Département Industries Agricoles et Alimentaires, Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques ESSA, Université D'Antananarivo,

Zhao J., Chen S. etAgboola S.O., (2003). Effect of starter culture on the biochemical and sensory properties of ovine cheese manufactured with a plant coagulant. *Austrialian J. of DairyTechn.*, 58 (2), 219.

Www .maep.gov/filtech.gingembre.htm (2010).

Annexes

Annexes

Annexe 1

Produits et appareillage

1. Produits

Acide chlorhydrique HCL (0.1N) (Carlo Erba).

Hydroxyde de sodium NaOH (0.1) (Panreac).

Phénolphtaléine 1% (Panreac).

Solution de Bleu de Coomassie G-250.

Sérum albumine bovine.

Solution tampon d'Acétate de Sodium (0.1M à pH=5).

Acide borique (0.2%).

Chlorure de calcium CaCl_2 .

Sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Soude dornic (N /9).

2. Matière première utilisée

2.1. Lait

Le lait employé du lait écrémé en poudre (Loya). Il est reconstitué par dissolution de 12g de poudre de lait écrémé dans 100ml d'une solution de chlorure de calcium 0.01M.

Le lait écrémé ainsi reconstitué est appelé substrat de BERRIDGE. Le lait sera stocké dans congélateur.

La poudre du lait utilisé provienne du même lot et conservée à température ambiante et à l'abri de lumière et d'humidité.

Annexes

2.2. Présure

La présure utilisée est une présure commerciale de force 1/100.000 à 520 mg de chymosine /1g de poudre de présure.

La poudre de présure est conservée à 4°C. A Partir de cette poudre, nous avons préparé une solution mère par reconstitution de 1g de poudre dans 100 ml d'eau distillée .Cette solution est conservée à 4°C durant 3 jours maximum.

Lors de chaque utilisation nous avons procédé à des dilutions dans de l'eau distillée à partir de la mère d'une façon à avoir un temps cette floculation à 30°C compris entre 12 et 15 min.

2.3. Rhizomes de Gingembre

La matière première utilisée dans notre étude est le Rhizomes de gingembre. Ces rhizomes se reconnaissent à colorent jaune foncé, L'utilisation de ces rhizomes pour l'obtention enzyme coagulante de lait.

3. Appareillage

Centrifugeuse.

Balance analytique.

Agitateur magnétique.

Etuve.

Bec bunsen.

Bain marie.

Mortier et pilon.

Congélateur.

Chronomètre.

Spectre photomètre.

PH mètre.

Incubateur.

Annexes

Micropipette.

Boite de Pétrie.

4. Milieux de culture

Gélose PCA : plate count agar.

DCLA : gélose désoxycholate lactosé à 1%.

Gélose chapman.

Bouillon SFB (Sélénite Acide de Sodium Cystéine).

Gélose HEKTOEN.

Giolliti cantoni.

Tellurite de potassium.

Kowacs.

Rappaport Vassiliadis.

Annexes

Annexe 2

Préparation d substrat de BERRIDGE

1. Les constituants du substrat de BERRIDGE

1.1. Lait en poudre

Le lait en poudre utilisée est de type LOW-HEART obtenu à partir 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 soluble du sérum .Elle est conservé dans sachets en plastique à +4°C.

1.2. Solution de CaCl₂

La solution de CaCl₂ de qualité anhydre utilisé à une concentration de 0.01M, elle est préparation à partir d'une solution mère de CaCl₂ à 1 M. La solution est conservé à +°C à l'obscurité.

1. Mode opératoire

Pour préparer 100 ml de substrat de BERRIDGE, on dissous 12g de lait en poudre dans 10ml de CaCl₂ à 0.01 M et complète la quantité par l'eau distillé jusqu'à à 100 ml. On verse tout d'abord une petite quantité de solution sur la totalité de la poudre de façon à obtenir par agitation manuelle une bouillé, le reste de la solution de chlorure de calcium est alors ajouté sur cette bouillé, puis agité avec un agitateur magnétique pendant 30 mn en évitant une agitation trop violente susceptible de produire une mousse géante. Le pH du lait ainsi préparé est ajusté à pH =6.4 avec une solution de HCl à 1N ou NaOH à 1N.

Après un repos de 30mn à température de laboratoire, le substrat est prêt à l'emploi.

Annexes

Substrat (lait écrémé en poudre LOW-HEART 12g dissout dans 100ml d'une solution

Aqueuse de CaCl_2 qui doit être progressivement)



Agitation pendant 15min (éviter l'agitation trop violente susceptible de produire une

Mousse gênante)



Ajusté le pH à 6.4 avec une solution de HCl à 0.1N ou NaOH à 0.1N



Repos à 30mn à température du laboratoire à la l'obscurité



Répartition (10 ml / tube à essai)



Incubation à 30°C au bain marie, ensuite remontrée la température à 35°C



Addition de l'enzyme (à raison de 1ml)

Diagramme de préparation du substrat de BERRIDGE et mesure du temps de Coagulation

- Le temps de coagulation est relevé visuellement dès l'apparition des premiers flocons De micelles sur paroi du tube à essai légèrement incliné et tourné lentement à raison de 2 à 4 tr / min dans un bain marie.

Annexes

Annexe 3

Dosage des protéines de l'extrait enzymatique selon la méthode de BRADFORD (BRADFORD, 1976).

1. Réactifs

1.1. Réactif de BRADFORD :

- 10mg de Bleu de Coomassie G-250.
- 5ml d'éthanol à 96%.
- 10ml d'acide orthophosphorique (H_3PO_4) à 85%.

Ce réactif de peut être conservé à 4°C et à l'abri de lumière.

1.2. Solution de BSA :

- BSA à 100mg.
- Qsp à 100ml l'eau distillée.

2. Mode opératoire

2.1. Préparation du réactif de BRADFORD

Dissoudre 10mg de Bleu de Coomassie G-250 dans d'éthanol à 96%. Après dissolution complète, ajouter 10ml d'acide orthophosphorique (H_3PO_4). Compléter à 100ml et filtrer le réactif. Le conserver maximum 15j l'abri la lumière.

2.2. Préparation de solution de BSA

Préparer une solution à 100mg/l dans l'eau ultra-pure. Pour cela, préparer une solution à 1g/l et la diluer 10 fois avec l'eau ultra-pure. Aliquote en fractions de 10ml dans des tubes et les conserver au congélateur.

Annexes

Tableau 1 : Préparation de la solution étalon de la BSA

N° de tube	1	2	3	4	5	6
Concentration en BSA ($\mu\text{l} / \text{ml.}\dot{\text{e}}\text{q BSA}$)	0	10	25	50	75	100
Volume de solution mère de BSA (μl)	0	100	250	500	750	1000
Volume d'eau (μl)	1000	900	750	500	250	0
Réactif de BRADFORD (ml)	1	1	1	1	1	1

- Les tubes sont incubés à température ambiante pendant 5min à l'abri de la lumière.
- Lire les D.O à 595nm des 5 tube (2 de à 6) contre le blanc (tube N°1).
- Le tracé les de la courbe d'étalonnage de la D.O en fonction de la concentration en BSA.
- Pour détermination la concentration en protéine contenues dans l'extrait enzymatique brut

On trouve un tube à essai et en verse 0.1ml de l'extrait enzymatique brut et 1 ml de réactif de Bradford puis en liée l'absorbance à 595nm au spectrophotomètre est sont déterminée à l'aide d'une projection sur e courbe étalon.

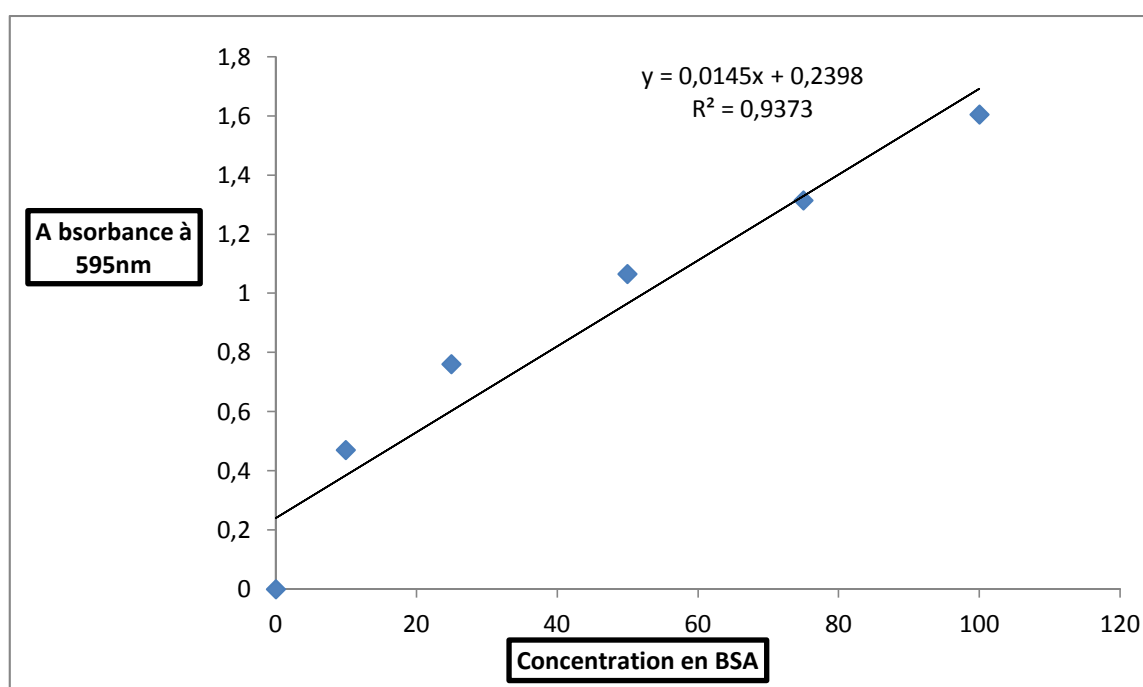


Fig : Courbe étalon du dosage des protéines selon la méthode de Bradford.

Annexes

Annexe 4

Tableau de préparation par addition de sulfate d'ammonium solide à 25°C

(J kurman., J Rasic. 1978).

Annexes

Annexe 5

1. Définition des microorganismes recherchés

1.1. Germes Aérobie Mésophile Totaux (G A M T)

La flore mésophile totale regroupe tous les germes aérobies et anaérobies facultatifs qui sont dénommés germes banaux (**Saubusse Marjorie 2012**).

1.2. Levure et Moisissures

Les levures et les moisissures sont des champignons hétérotrophes, organismes eucaryotes uni ou multicellulaires un groupe morphologique relativement homogène (**Saubusse Marjorie 2012**).

1.3. Spores des Anaérobies S/R

Les Anaérobies Sulfito- Réducteurs sont des bactéries anaérobies strictes, de forme bacille à gram positif, catalase négative, mobiles, sporules, appartenant à la famille des Bacillacea, hôte habituel du tube digestif de l'homme, leurs spores ont une résistance considérablement dans les milieux naturels, ils ont un pouvoir de détruire le sulfite de sodium et donner en présence de fer, du sulfure de fer d'où une coloration noire (**Saubusse Marjorie 2012**).

1.4. Coliformes totaux et fécaux

Les coliformes totaux sont des bacilles à Gram négatifs, aérobies ou anaérobies facultatifs, non sporules, ne possèdent pas d'oxydase, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production l'acide et de gaz en 24 à 48 h à une température comprise entre 36 et 37°C (**Saubusse Marjorie 2012**).

Les coliformes fécaux ont les mêmes caractères des coliformes totaux, mais ils sont capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 24h à une température de l'ordre de 44°C (**Saubusse Marjorie 2012**).

Rappelons également qu'*Escherichia coli* est un coliformes thermo tolérant qui produit en plus, de l'indole à 44 °C (**Saubusse Marjorie 2012**).

Annexes

1.5. Staphylococcus aureus

Les staphylococcus aureus appartiennent à la famille de Micrococcaceae. Ce sont Cocci à Gram positif. Ils sont aérobies et anaérobies facultatifs, immobiles (Saubusse Marjorie 2012).

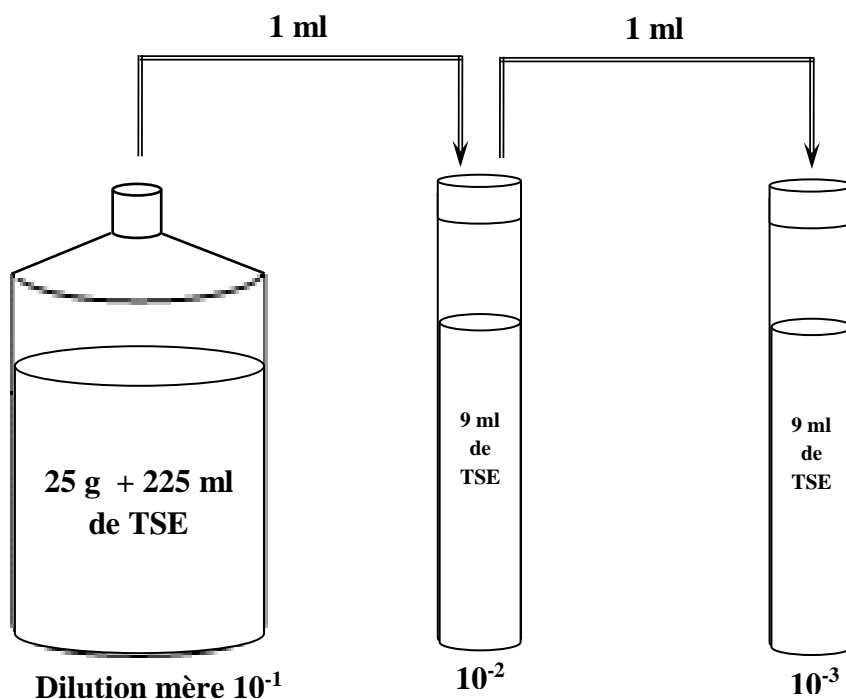
1.6. Salmonella

Les bactéries de genre Salmonella appartiennent à la famille des Enterobactiaceae dont elles possèdent les principaux caractères

Bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs, habituellement mobiles grâce à une ciliature péritriche, mais Salmonella gallinarum est toujours immobiles, elles possèdent une catalase, réduisent les nitrates en nitrites, fermentant les glycose avec production d'acide et de gaz (Saubusse Marjorie 2012).

2. Analyses microbiologique du fromage

Préparation des solutions mères



Annexes

2.1. Dénombrement de GAMT

Mode opératoire

A partir des dilutions décimales allant de 10^{-3} à 10^{-1} , porter aseptiquement 1 ml dans une boîte de pétri vide préparée à cet usage et numérotée.

Compléter ensuite avec 12 à 15 ml de gélose PCA fondue puis refroidie à $45\text{ °C} \pm 1$. Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de (8) pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose utilisée. Laisser solidifier sur la paillasse, puis rajouter une deuxième couche d'environ 5 ml de la même gélose, cette double couche à un rôle protecteur contre les contaminations diverses.

Incubation

Les boîtes seront incubées couvercle en bas à 30°C pendant 72 h avec :

- Première lecture à 24 h.
- Deuxième lecture à 48 h.
- Troisième lecture à 72 h.

Lecture

Les colonies des GAMT se présentent sous forme lenticulaire en masse.

Expression des résultats

Le dénombrement s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte les facteurs suivants :

- ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies,
- multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution,
- faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

Annexes

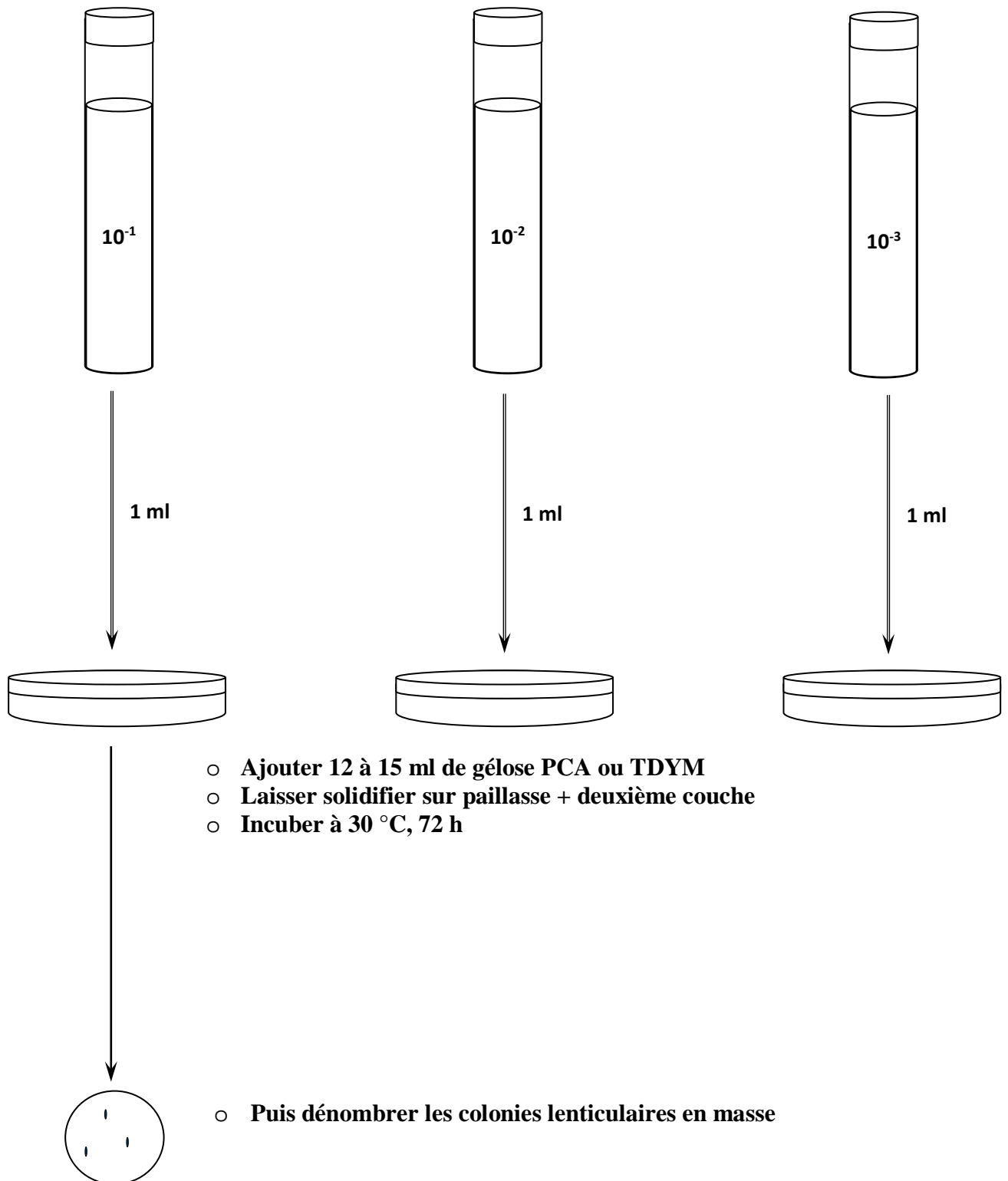


Fig. 1. Recherche et dénombrement des GAMT

Annexes

2.2. Dénombrement de Coliformes totaux et fécaux

Mode opératoire

A partir des dilutions décimales 10^{-3} à 10^{-1} , dans une boîte de pétri vide préparée à cet usage et numérotée. Cette opération doit être effectuée en double pour chaque dilution car :

La première série de boîtes sera incubée à 37 °C et sera réservée à la recherche des coliformes totaux.

La deuxième série de boîtes sera incubée à 44 °C et sera réservée à la recherche des coliformes fécaux.

Compléter ensuite avec environ 15 ml de gélose au Désoxycholate à 1‰ (ou avec gélose VRBL) fondue puis refroidie à $45\text{ °C} \pm 1$.

Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de (8) pour bien mélanger la gélose à l'inoculum.

Laisser solidifier les boîtes sur la paille, puis couler à nouveau environ 5 ml de la même gélose ; cette double couche a un rôle protecteur contre les diverses contaminations.

A partir des dilutions décimales 10^{-3} à 10^{-1} , porter aseptiquement 1 ml de chaque dilution dans des tubes contenant eau peptone exempte d'indole numérotés et préparés à cet usage. Mélanger bien.

Incubation

Les boîtes pétris seront donc incubées couvercle en bas pendant 24 à 48 h à :

- 37 °C pour la première série (recherche des coliformes totaux)
- 44 °C pour la deuxième série (recherche des coliformes fécaux)

Les tubes seront donc incubés à 44 °C pendant 24 à 48 h (identification biochimique des coliformes fécaux).

Lecture

Les colonies des coliformes totaux et fécaux apparaissent en masse sous forme de petites colonies de couleur rouge foncé et de 0,5 mm de diamètre.

Annexes

Expression des résultants

Le dénombrement s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte les facteurs suivants :

- ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies,
- ne dénombrer les colonies des coliformes fécaux qu'après une réaction indole +.
- multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution,
- faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

Confirmation

Passer au test de confirmation en cas d'existence de coliformes fécaux en ajoutant des quelques gouttes de réactif KOWACS dans les tubes réservés à l'identification biochimique.

L'apparition d'un anneau rouge en surface indique que la réaction est positive.

Annexes

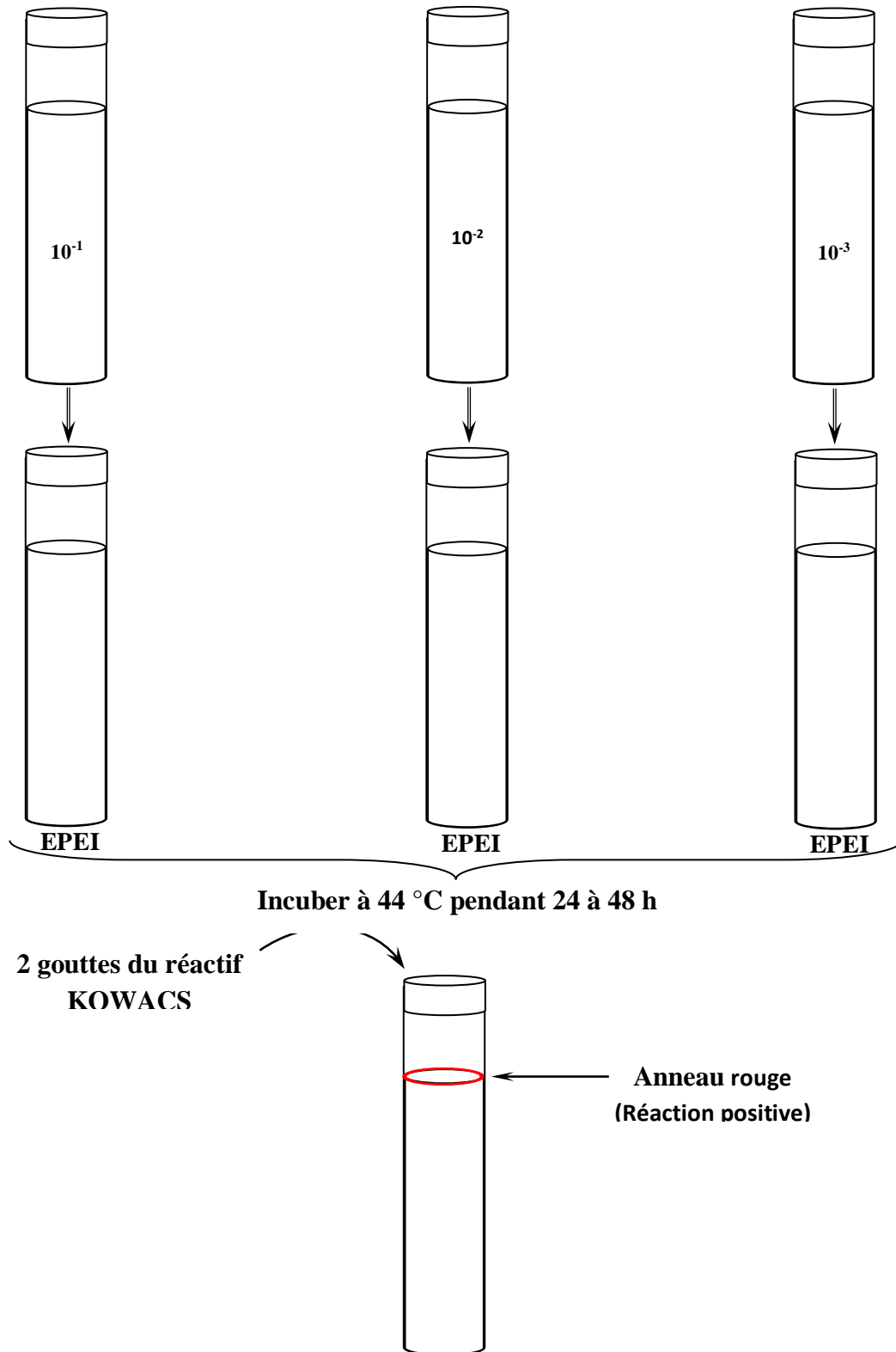


Fig.2. Recherche et dénombrement des coliformes

Annexes

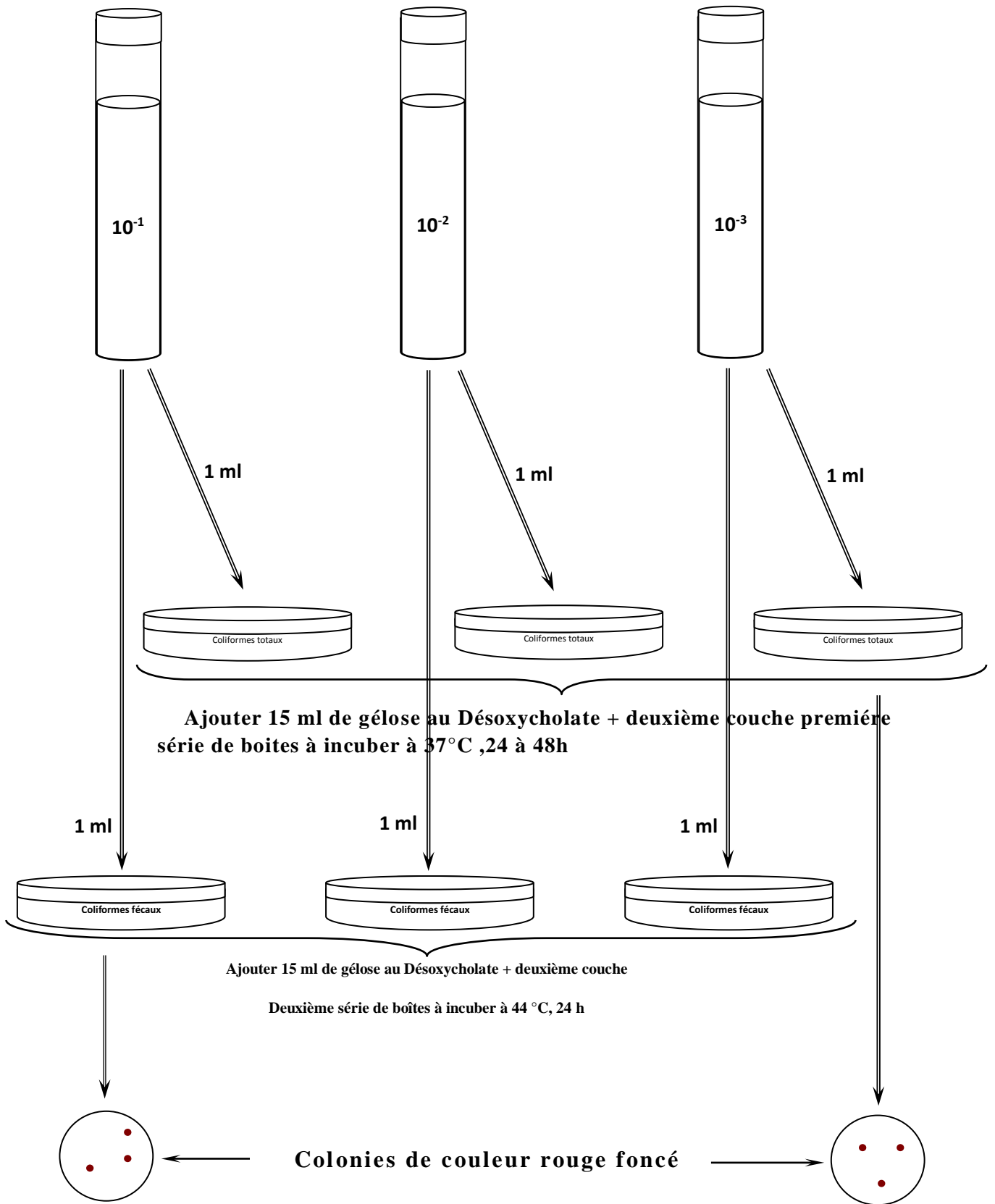


Fig. 3. Test de confirmation des coliformes fécaux

3. Dénombrement des levures et moisissures

Mode opératoire

A partir des dilutions décimales retenues (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}), transférer aseptiquement 4 gouttes de chaque dilution aux boîtes de pétri contenant le milieu OGA préalablement fondu et solidifié. Etaler sur toute la surface du milieu à l'aide d'un râteau stérile.

Incubation

L'incubation de ces boîtes se fait à 20 °C couvercle en bas pendant 5 jours en surveillant quotidiennement les boîtes pour éviter l'envahissement des moisissures sur le milieu.

Lecture

Les colonies des levures sont bouillantes, rondes et bondées, de couleurs différentes, de formes convexes ou plates et souvent opaques.

Les colonies de moisissures sont épaisses, filamenteuses, pigmentées ou non, à aspect velouté et sont plus grandes

Expression des résultants

Le dénombrement s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte les facteurs suivants :

- ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies
- multiplier le nombre trouvé par 5
- multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution
- faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

Annexes

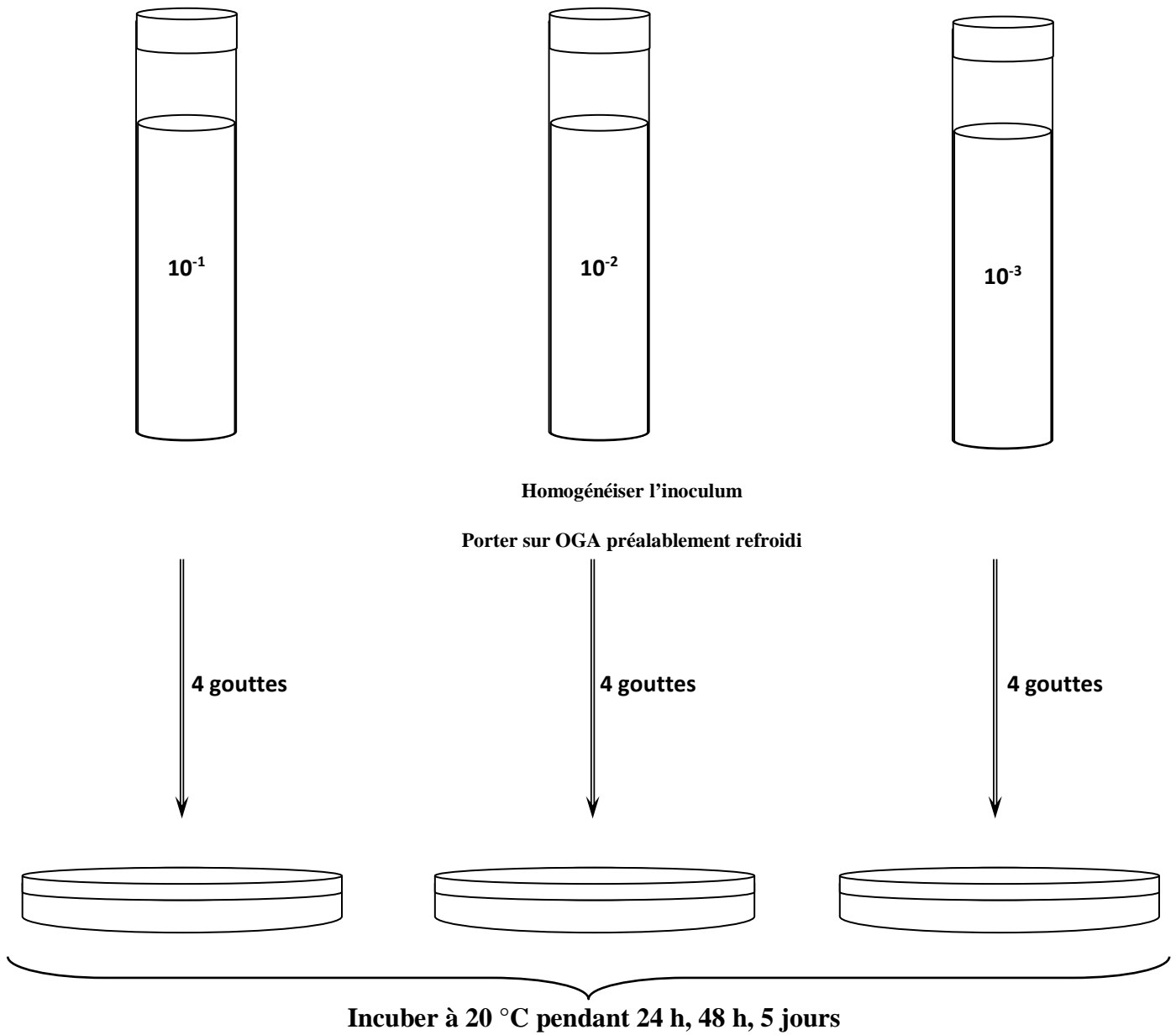


Fig. 4. Recherche et dénombrement des levures et moisissures

4. Recherche de *Staphylococcus aureus*

Mode opératoire

• Préparation du milieu d'enrichissement

Au moment de l'emploi, ouvrir aseptiquement le flacon contenant le milieu Giolitti Cantoni pour y ajouter 15 ml de la solution de Tellurite de potassium. Mélanger soigneusement. Le milieu est alors prêt à l'emploi.

• Enrichissement

A partir des dilutions décimales retenues, porter aseptiquement 1 ml par dilution dans un tube à vis stérile. Ajouter par la suite environ 15 ml du milieu d'enrichissement. Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation

L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 à 48 h

Lecture

Seront considérés comme positifs, les tubes ayant virés au noir. Pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un développement de *Staphylococcus aureus*, ces tubes feront l'objet d'un isolement sur gélose Chapman préalablement fondue, coulée en boîtes de pétri et bien séchée.

Les boîtes de Chapman ainsiensemencées seront incubées à leur tour à 37 °C pendant 24 à 48 h. après ce délai, repérer les colonies suspectes à savoir les colonies de taille moyenne, lisse, brillantes, pigmentés en jaune et pourvues d'une coagulase et d'une catalase.

Expression des résultats

- Si à la dilution 10^{-3} , le tube a noirci au bout de 24 h d'incubation, mais à l'isolement sur Chapman il n'y a pas des colonies caractéristiques ; ce tube est considéré comme négatif.
- Si par contre à la dilution 10^{-1} , le tube a noirci au bout de 24 h d'incubation, et à l'isolement, il y a des colonies caractéristiques, il faut tenir compte de la dilution en question, car le nombre réel de *Staphylococcus aureus* correspond à l'inverse de la dilution. Dans ce cas, il y a donc 10 *Staphylococcus aureus* par g ou ml du produit à analyser.

Annexes

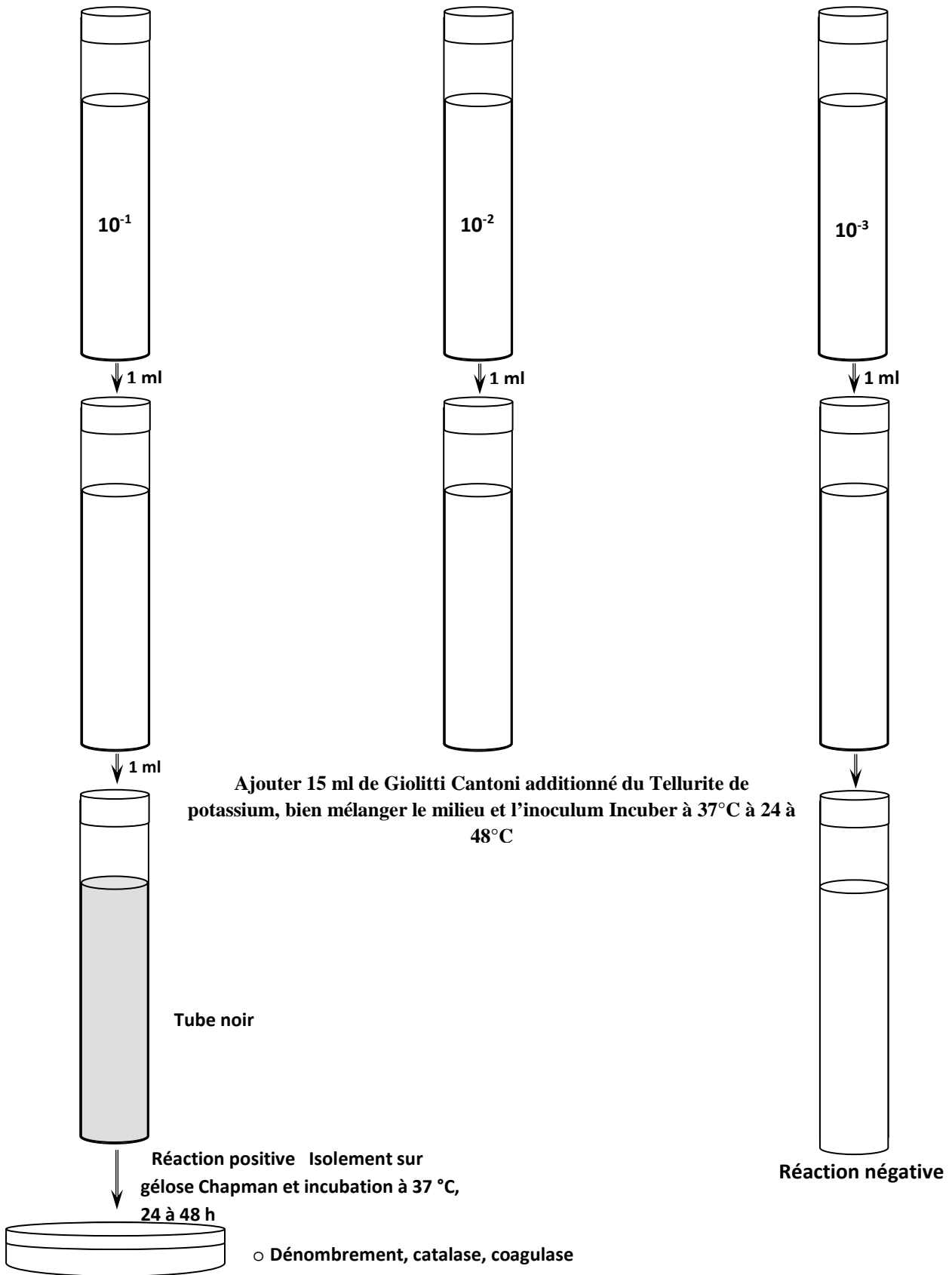


Fig. 5. Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*.

Annexes

5. Recherche de *Salmonella*

Mode opératoire

La recherche de *Salmonella* nécessite une prise d'essai à part.

• Pré enrichissement

Mettre 25 g de produit à analyser dans un flacon de 225 ml de TSE et bien homogénéiser.

Incuber à 37 °C pendant 18 h

• Enrichissement

L'enrichissement doit s'effectuer sur deux milieu sélectifs différents à savoir que :

- le milieu de Rappaport Vassiliadis réparti à raison de 10 ml par tube,
- le milieu de Sélénite-Cystene réparti à raison de 100 ml par flacon.

L'enrichissement proprement dit, se fait donc à partir du milieu de pré-enrichissement de la façon suivante :

- 0,1 ml pour le tube de Rappaport Vassiliadis,
- 10 ml pour le flacon de Sélénite Cystene.

■ Isolement

Le tube et/ou le flacon positifs fera/feront l'objet d'un isolement sur le milieu sélectif "Hektoen".

■ Lecture

Les *Salmonelles* se présentent sous forme des colonies bleues vertes au centre noir sur gélose Hektoen.

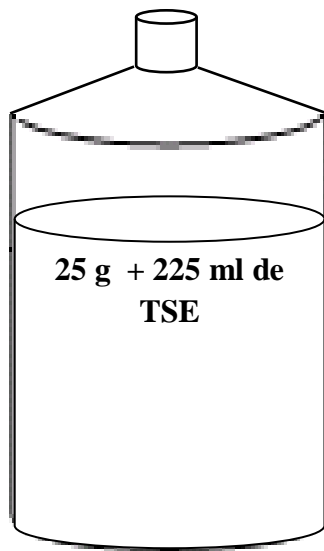
■ Confirmation

Toutes les colonies caractéristiques feront l'objet d'une identification morphologique biochimique et sérologique qui se déroule comme suit :

Annexes

- état frais (forme, mobilité),
- coloration de Gram (forme et Gram),
- ensemencement dans un tube de TSI qui sera incubé à 37 °C pendant 24 h (fermentation des glucides, production du gaz et de H₂S).
- ensemencement dans un tube de gélose nutritive inclinée qui sera incubé à 37 °C pendant 24 h, etc.

1^{er} jour : pré enrichissement



Incuber à 37 °C pendant 24

2^{eme} jour : Enrichissement

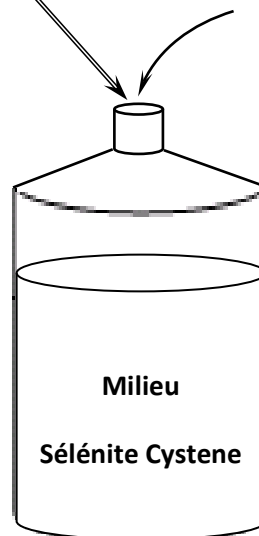
0,1 ml

10 ml

Cystine

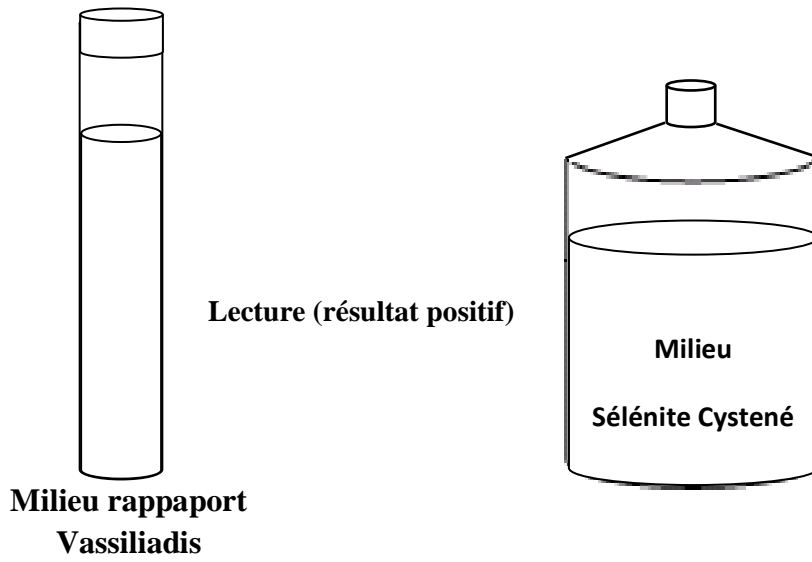


Incuber à 37 °C pendant 24 h



Annexes

3^{eme} jour : Isolement



Isolement sur (Hektoën +
additif Hektoen)



4^{eme} jour : lecture et identification

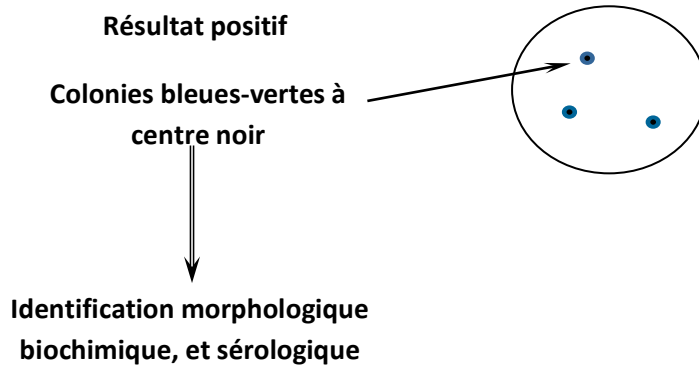


Fig.6. Recherche de Salmonella.

Annexes

2.6. Mode opératoire Anaérobies Sulfito – Réducteurs (clostridium)

- **Préparation du milieu**

Au moment de l'emploi, faire fondre un flacon de gélose viande foie (VF), le refroidir dans un bain d'eau à 45 °C puis ajouter une ampoule d'Alun de fer et une ampoule de sulfate de sodium. Mélanger soigneusement et aseptiquement.

Le milieu est ainsi prêt à l'emploi, mais il faut le maintenir dans une étuve à 45 °C jusqu'au moment de l'utilisation.

- **Enrichissement**

Les tubes contenant les dilutions 10^{-2} et 10^{-1} seront soumis :

D'abord à un chauffage à 80 °C pendant 8 à 10 min, Puis à un refroidissement immédiat sous courant d'eau, dans le but d'éliminer les formes végétatives et garder uniquement les formes sporulées.

A partir de ces conditions, porter aseptiquement 1 ml de chaque dilution en double dans deux tubes à vis stériles de 16 mm de diamètre, puis ajouter environ 15 ml de gélose VF prêt à l'emploi. Laisser sur la paillasse pendant 30 min.

Annexes

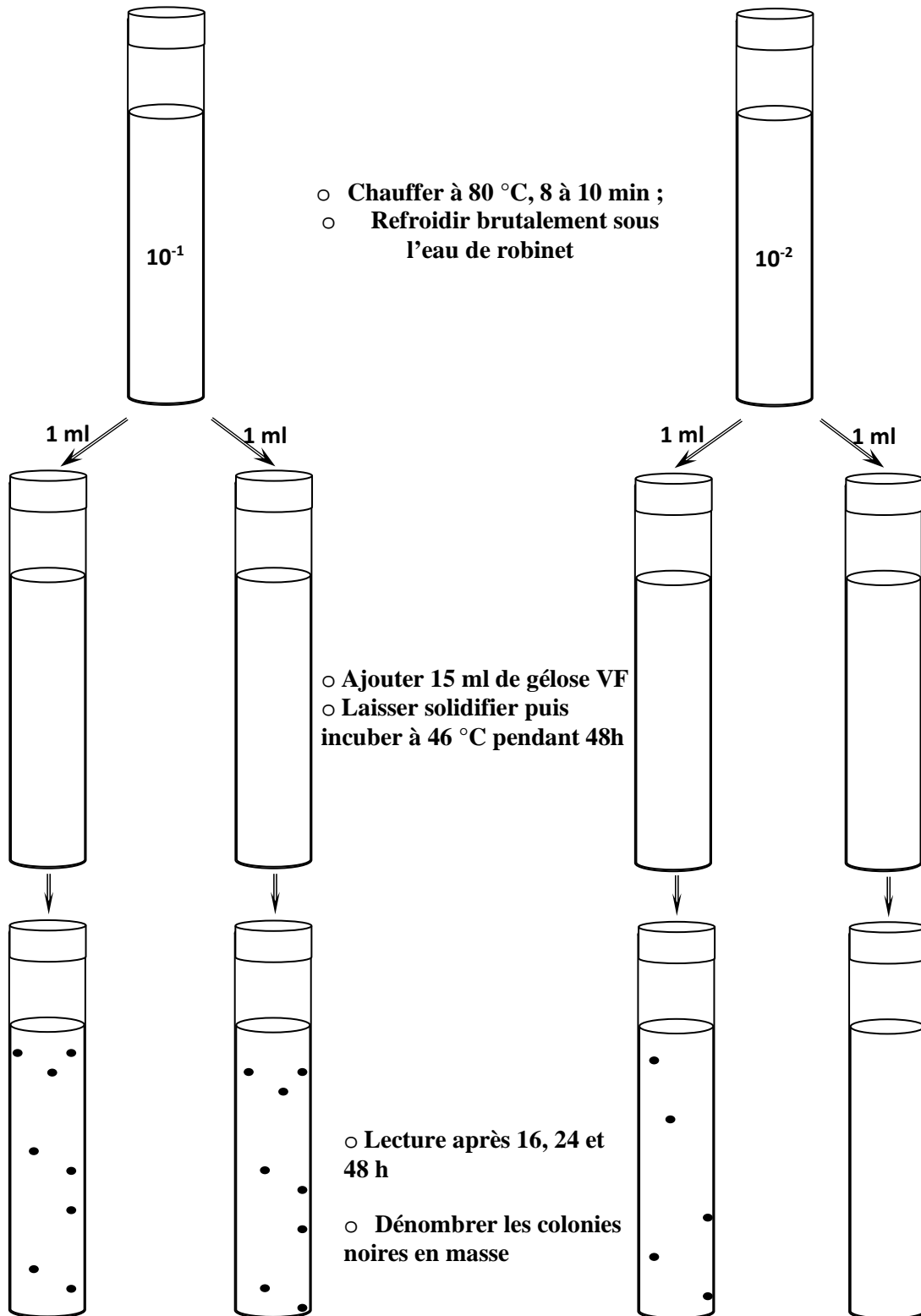


Fig. 7. Recherche et dénombrement des spores de *Clostridium sulfito-réducteurs*