RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Spécialité **Microbiologie Appliquée**

Présenté par **-Zeghdar Maria Lina**

-Ladeg Fatima

THEME

Essai de fabrication d'un fromage à base d'enzyme coagulante extraite à partir des souches lactiques isolées localement

Soutenue publiquement le 30/06/2025

Devant le jury

Nom et Prénom	Grade	Statue	Établissement
TOUZOUT Nabil	MCB	Président	Université de Médéa
BOUMEDIENE Farida	MCB	Examinatrice	Université de Médéa
BOUCHIBANE Malika	MCB	Encadreur	Université de Médéa

Année Universitaire 2024-2025

Remerciement

Avant tout développement sur cette expérience il apparaît opportun de commencer ce travail par des remerciements.
Nous remercions Allah le Tout puissant et le bienveillant, de nous avoir accordés le succès, ses bénédictions, la santé et surtout le courage d'accomplir ce travail et que sans lui nous ne serions pas là.

Nous remercions notre encadreur Dr. Bouchibane Malika ,Maître conférence B à l'université Dr. Yahia Fares de Médéa, pour votre précieux encadrement, vos conseils avisés et votre soutien constant. Votre expertise et votre patience ont été d'une aide inestimable dans la réalisation de ce projet.

Nous remercions Dr. Touzout Nabil M.C.B. à l'université de Médéa nous avoir fait l'honneur de présider ce jury .

Nous tenons aussi à remercier Dr. Boumadiane Farida M.C.B. à l'université de Médéa pour avoir accepté d'examiner ce travail .

Nous remercions également nos familles et nos proches, pour leurs mots rassurants, leurs gestes réconfortants et leur indéfectible soutien dans les moments de doute. Vous avez su rendre ce parcours plus doux.

Dédicace

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

Je dédie ce travail à :

À ceux qui ont vécu la vie pour moi
À ceux qui ont instillé un rêve dans mon cœur et l'ont arrosé de supplications, à ceux quiétaient la lumière et l'ombre de mon chemin quand les jours m'encombraient...
À ma mère "Oum Elkhir" et mon père "Laid ", le sens et la beauté de la vie.

À mon frère "Islam"
Tu as toujours été là pour moi, me soutenant avec amour et croyant en moi, même dans les moments les plus difficiles.Ta présence et ta .confiance m'ont donné la force d'avancer et de persévérer

,À mes chères sœurs "Aya" et "Hadil" pour leur gentillesse .leur affection, amour, sacrifices et encouragement

,À vous, mes chères tantes
Mercipour ton amour, tes prières sincères, tes encouragements constants .et ta présence rassurante tout au long de mon parcours

Cette graduation n'est pas la conclusion d'une carrière
Plutôt, c'est l'aboutissement de votre amour, patience et soutien sans fin.

Maria Lina

Dédicace

remercie Dieu qui m'a accordé la force et la santé.
À mon père que je n'ai jamais vu, mais que j'ai senti à chaque instant. À celui que la vie ne m'a pas permis de rencontrer, mais avec qui je partage le sang, les prières et la nostalgie. À celui que je ne connaissais pas, mais que j'ai reconnu dans mes traits, et à travers sa protection dans cette photo qui nous unit. À toi, qui as disparu de mes yeux, mais jamais de mon cœur. À celui qui a grandi dans mon imagination, et qui a construit un monde dans mon cœur qu'aucun autre n'a pu atteindre. J'ai grandi en manquant ton étreinte, en imaginant comment serait le moment où je te reverrais.
Je t'offre ma réussite, je lève mon diplôme vers le ciel, dans l'espoir qu'il te parvienne, et je souhaite que ce succès soit inscrit dans le registre de tes bonnes actions.
À celle qui n'a pas été qu'une mère, mais aussi une étreinte, une épaule, un soutien, un exemple, et un père que je n'ai jamais eu. Toi qui as porté les jours les plus lourds et affronté la vie avec fierté, sans jamais casser,
celle qui ne m'a jamais laissée ressentir un manque,
À mon frère Abdelghani, qui a été pour moi un père plein de douceur, un ami en tout temps, un soutien inébranlable, celui qui m'a donné un amour sans limites.
À mes chères sœurs, si bienveillantes et douces 'Fadila' ,' Akila', 'Nacira', Habiba', vous avez été un appui à chaque instant. Votre amour et votre soutien ont été la force et la lumière qui ont illuminé mon chemin à chaque étape.
À mes autres frères 'Mohamed' et 'Ilyas', merci d'être présents dans ma vie et pour tout le soutien que vous m'avez apporté.
À ma précieuse amie, qui m'a accompagnée tout au long du parcours universitaire, qui a partagé les moments de fatigue et de joie, qui a écouté mes paroles et mes soucis avec patience et tendresse — tu es une partie intégrante de ce voyage et ma partenaire dans cette réussite.

Fatima

ملخص

في ظل الاهتمام المتزايد بالحلول البيوتكنولوجية المستدامة واستغلال الموارد الميكروبية المحلية، استكشفت هذه الدراسة إمكانيات سلالات البكتيريا لاكتيك LAB) المعزولة محليًا في الجزائر لإنتاج الإنزيمات التخثرية المخصصة لصناعة الجبن. الهدف الرئيسي من هذا العمل كان عزل بكتيريا لاكتيك (LAB) التي تمتلك نشاطًا إنزيميًا تخثريا وتقييم أدائها في إنتاج الجبن. شملت المنهجية استخراج الانزيمات المخثرة من السلالات المعزولة محليًا. تم إجراء تحليلات للنشاط التخثري (AC)والبروتيني(AP) ، بالإضافة إلى محتوى البروتينات الكلي، لتقييم أداء المستخلصات. تمت دراسة طريقتين للتخثر: الإنزيمية والمختلطة، التي تجمع بين الإنزيمات و سلالات لاكتيكية. أظهرت النتائج تباينًا كبيرًا بين السلالات. من بين السلالات المدروسة، تميزت سلالة *Apilactobacillus kunkeei*المشفرة (ABوD BLBM)بنشاط تخثر قوي (حتى US 320)عند 55 درجة مئوية وارتفاع محتوى البروتينات اكثر من 200ميكروغرام/مل). و أيضًا عند درجة حموضة 6.4–6.2، بالإضافة إلى فعالية عند تركيز كاليسيوم (0.055 %) ومع ذلك، فإن نشاطها البروتيني المفرط قد يتطلب تنظيمًا للحفاظ على الجودة الحسية للجبن. من ناحية أخرى، قدمت سلالة *Limosilactobacillus fermentum* مشفرة بـBLBM Oوسلالة*Lactiplantibacillus plantarum* مشفرة ب BLBM S13 توازنًا جيدًا بينالنشاط التخثري و البروتيني، مما يجعلهما واعدين لتطبيقات الأجبان الأكثر نعومة. تم تطبيق هذه الإنزيمات الميكروبية المسببة للتخثر بعد ذلك في اختبار تصنيع الجبن، مما أظهر جدوى وفعالية استخدامها، و اقتراح بديلاً طبيعياً ومستداماً للمواد المسببة للتخثر التقليدية.

الكلمات المفتاحية

البكتيريا لاكتيك ، الإنزيمات التخثرية، صناعة الجبن، Limosilactobacillus fermentum، Lactiplantibacillus plantarum.

Résumé

Face à l'intérêt croissant pour les solutions biotechnologiques durables et la valorisation des ressources microbiennes locales, cette étude a exploré le potentiel de souches de bactéries lactiques (LAB) isolées localement en Algérie pour la production d'enzymes coagulantes destinées à la fabrication de fromage. L'objectif principal de ce travail était d'isoler des LAB possédant une activité enzymatique coagulante et d'évaluer leur performance dans la production fromagère. La méthodologie a inclus l'extraction des enzymes coagulantes à partir des souches isolées localement. Des analyses de l'activité coagulante (AC) et protéolytique (AP), ainsi que de la teneur en protéines totales, ont été réalisées pour évaluer la performance des extraits. Deux modalités de coagulation ont été examinées : enzymatique pure et mixte, combinant enzymes et cultures lactiques. Les résultats ont révélé une grande variabilité inter-souches. Parmi les souches étudiées, *Apilactobacillus kunkeei* codées (BLBM D et AB) s'est distinguée par une forte activité coagulante (jusqu'à 320 US à 55 °C) et une haute teneur en protéines (>200 µg/mL). et à pH 6.2–6.4, ainsi qu'une efficacité à faible concentration en $CaCl_2$ (0,055 %). Cependant, leur activité protéolytique excessive pourrait nécessiter une régulation pour préserver la qualité organoleptique du fromage. En revanche, *Limosilactobacillus fermentum* BLBM O et *Lactiplantibacillus plantarum* S13 ont offert un bon compromis AC/AP, les rendant prometteuses pour des applications fromagères plus douces. Ces enzymes coagulantes d'origine microbienne ont ensuite été appliquées à l'essai de fabrication d'un fromage, démontrant la faisabilité et l'efficacité de leur utilisation, et offrant une alternative naturelle et durable aux coagulants traditionnels.

Mots-clés

Bactéries lactiques, enzymes coagulantes, fabrication de fromage, *Limosilactobacillus fermentum, Lactiplantibacillus plantarum.*

Abstract

Driven by the growing interest in sustainable biotechnological solutions and the valorization of local microbial resources, this study explored the potential of locally isolated Lactic Acid Bacteria (LAB) strains in Algeria for producing coagulating enzymes for cheese manufacturing. The main objective was to isolate LAB with coagulating enzymatic activity and evaluate their performance in cheese production.The methodology involved extracting coagulating enzymes from locally isolated strains. Analyses of coagulating activity (CA)**,** proteolytic activity (PA), and total protein content were conducted to assess the extracts' performance. Two coagulation methods were examined: pure enzymatic and mixed, combining enzymes and lactic cultures. Results revealed significant inter-strain variability. Among the studied strains, *Apilactobacillus kunkeei* (coded BLBM D and AB) stood out with high coagulating activity (up to 320 US at 55°C) and a high protein content (>200 µg/mL). and pH 6.2–6.4, as well as efficiency at low $CaCl_2$ concentrations (0.055%). However, their excessive proteolytic activity might require regulation to preserve the cheese's organoleptic quality. In contrast, *Limosilactobacillus fermentum* BLBMO and *Lactiplantibacillus plantarum* S13 offered a good CA/PA compromise, making them promising for milder cheese applications. These microbially-derived coagulating enzymes were then applied in a cheese-making trial, demonstrating the feasibility and efficacy of their use, and offering a natural and sustainable alternative to traditional coagulants.

Keywords

Lactis acid bacteria, coagulating enzymes, cheese manufacturing, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus plantarum.*

Listes Des Abréviations

AC : Activité coagulante

AP: Activité Protéolytique

AFNOR: Association Française de Normalisation

DO: Densité Optique

EEB : Extrait Enzymatique Brute

EST : Extrait Sec Totale

ESD : Extrait Sec Dégraissé

FEEB: Fromage fait à base d'extrait enzymatique brute

FAO: Food and alimentation organisation

MG: Matière Grasse

BL : Bactéries Lactiques

TCA : Acide Trichloracétique

UP : Unité Présure

US : Unité Soxhlet

N: Normalité

qPCR : Réaction quantitative en chaîne de la polymérase

PCA : Plate Count Agar

PCR : Polymérase Chain Réaction

MRS : Milieu de Man , Rogosa and Sharp

NAOH : Hydroxyde de Sodium

Lb : *Lactobacillus*

Lc : *Lactococcus*

Ln : *Leuconostoc*

Listes Des Figures

Figure 01: Schéma montrant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques.	**06**
Figure 02: Morphologie en microscope électronique de Lactobacillus bulgaricus .	**08**
Figure 03: Mécanisme d'action de la présure .	**14**
Figure 04: Fromage Frais de type ricotta	**18**
Figure 05: Camembert à croûte fleurie.	**19**
Figure 06: Fromage à croûte lavée type Munster.	**20**
Figure 07: Fromages à pâte persillée type Roquefort.	**21**
Figure 08: Fermentation au milieu semi-solide de son de blé+fenugrec.	**31**
Figure 09: Les étapes suivies durant le processus de préparation par coagulation mixte (Essais 1,2 et 3).	**37**
Figure 10: Les étapes suivies durant le processus de préparation par coagulation enzymatique (Essais 4, 5,6 et 7).	**38**
Figure 11: Aspect macroscopique des souches lactiques purifiées sur gélose et en bouillon.	**42**
Figure 12 : Morphologie cellulaire des souches lactiques révélée par la coloration de Gram.	**43**
Figure 13: Mise en évidence de l'activité protéolytique des souches sur différents milieux de culture.	**44**
Figure 14: Activité coagulante mesurée (F(US)) des extraits enzymatiques de souches de bactéries lactiques.	**46**
Figure 15 : Effet de la température sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique des LAB.	**51**

Listes Des Tableaux

Tableau 01: Composition en certain nutriments de différents variétés de fromage (pour 100 g de fromage ou en pourcentage de la matière sèche)	**23**
Tableau02: Les espèces des souches testées.	**27**
Tableau 03: La quantité des ingrédients intervenant dans la préparation.	**36**
Tableau 04: Évaluation de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques des souches lactiques et rapport AC/AP.	**48**
Tableau 05 : Teneur en protéines totales des extraits enzymatiques bruts lactiques (EEB) de différentes souches bactériennes lactiques.	**49**
Tableau 06: Effet du pH sur l'activité coagulante.	**52**
Tableau 07 : Activité coagulante (AC) selon le volume d'extrait enzymatique (µL / 10 mL).	**53**
Tableau 08 : Effet de la concentration en chlorure de calcium ($CaCl_2$) sur l'activité coagulante (AC) des extraits enzymatiques de différentes souches de bactéries lactiques.	**54**
Tableau 09 : Résumé des effets des paramètres physico-chimiques sur l'activité coagulante (AC) des extraits enzymatiques de LAB.	**55**
Tableau 10: Composition physico-chimique des fromages issus de coagulation mixte avec des extraits enzymatiques de bactéries lactiques.	**57**
Tableau 11 : Composition physico-chimique des fromages issus de coagulation enzymatique avec des extraits de bactéries lactiques.	**59**
Tableau 12 : Résultats d'analyse microbiologique des fromages issus de coagulation mixte et enzymatique.	**61**

TABLE DES MATIERES

Résملخص

ume

Abstract

Listes des abréviations

Listes des Figures

Listes des Tableaux

Introduction **01**

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1. Bactéries Lactiques

I.1.1. Définition des bactéries lactiques **04**

I.1.2. Origine et Habitat **04**

I.1.3. Classification des bactéries lactiques **05**

I.1.4. Lactobacilli **07**

I.1.5. Intérêt des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire **08**

I.1.6. Effet des bactéries lactiques sur les propriétés organoleptiques du fromage **09**

I.1.6.1. Développement de texture **09**

I.1.6.2. Développement de goût **09**

I.1.6.3. Développement d'arôme **09**

I.2. Enzymes Coagulantes

I.2.1. Définition des enzymes coagulantes **10**

I.2.2. Historique des enzymes coagulantes **10**

I.2.3. Types des enzymes coagulantes **10**

I.2.3.1. Enzymes d'origines animals **10**

I.2.3.2 Enzymes d'origines végétales **11**

I.2.3.3. Enzymes d'origines microbienne **11**

I.2.3.3.1. D'origine bacterienne 11
I.2.3.3.2. D'origine fongiques 12
I.2.4. Role des enzymes coagulantes dans fabrication de fromage 12
I.2.4.1. Coagulation enzymatique 13
I.2.5. Mécanisme d'action des enzymes coagulantes 13
I.2.6. Impact des enzymes coagulantes sur la qualité du fromage 14
I.3. Fromage
I.3.1. Définition de fromage 16
I.3.2. Dénomination et appellation 16
I.3.3. Historique de la fabrication du fromage à travers les âges 17
I.3.4. Types de fromages 17
I.3.4.1. Fromage à pâte frais 17
I.3.4.2. Fromage à pâte molle 18
I.3.4.3. fromages à croûte fleurie 18
I.3.4.4. fromages à croûte lavée 19
I.3.4.5. Fromage à pâte pressée 19
I.3.4.6. Pâtes pressées non cuites 20
I.3.4.7. Pâtes pressées cuites 20
I.3.4.8. Fromage à pâte persillée 21
I.3.4.9. Fromage parfumés 22
I.3.5. Compositions de fromage 22
I.3.5.1. Lipides 22
I.3.5.2 Glucides 22
I.3.5.3. Vitamines 22
I.3.5.4 .Minéraux 23
I.3.6. Procédés généraux de fabrication du fromage 24
I.3.6.1 Lait 24

I.3.6.2 Caillage ou la coagulation **24**

I.3.6.3 .Egouttage **25**

I.3.6.4 Processus de moulage et de salage **25**

I.3.6.5 .Affinage **25**

I.3.7. Caractères physique qui influencer fromage **25**

I.3.7.1. Humidité (teneur en eau) **26**

I.3.7.2. pH **26**

I.3.7.3. Teneur en sel **26**

Chapitre 2 : Matériel et Méthode

II.1. Lieu et objectif **27**

II.2. Matériel **27**

II.2.1 Matériel biologique **27**

II.2.2 Matériel non biologique **28**

II.3. Méthodes **28**

II.3.1. Revivification des souches **28**

II.3.2. Vérification de la pureté des souches lactiques **28**

II.3.2. 1.Test de catalase **28**

II.3.2. 2.Analyse macroscopique **28**

II.3.2. 3.Analyse microscopique **28**

II.3.2. 4. Conservation des souches **29**

II.3.3. Mise en évidence de l'activité Protéolytique **29**

II.3.4. Protocole d'obtention des extraits enzymatiques à partir de bactéries lactiques **30**

II.3.4.1. Préparation du milieu de culture et mise en fermentation **30**

II.3.4.2. Récupération des enzymes extracellulaires post-fermentation **31**

II.3.4.3. Évaluation de l'activité coagulante des extraits enzymatiques de bactéries lactiques **32**

II.3.4.4. Évaluation de l'activité protéolytique et du rapport AC/AP **33**

II.3.4.4.1. Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique **33**

II.3.4.5. Optimisation de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique de LAB **34**

II.4. Essaide fabrication du fromage par coagulation enzymatique et mixte **34**

II.4.1. Technologie de préparation **34**

II.4.1.1. Préparation des levains lactiques **34**

II.4.1.2. Préparation du fromage **35**

II.4.1.2.1. Essais de préparation par coagulation mixte (enzymatique + levains) **35**

II.4.1.2.2. Fabrication par coagulation exclusivement enzymatique **36**

II.5. Analyses physico-chimique et microbiologiques du produit fini (Fromage) **38**

II.5.1 Analyses physico-chimique **38**

II.5.1.1. Mesure du pH **39**

II.5.1.2. Détermination de l'acidité titrable **39**

II.5.1.3. Détermination de l'extrait sec total (EST) **39**

II.5.1.4. Détermination de la teneur en matière grasse (MG) **40**

II.5.1.5. Extrait sec dégraissé (ESD) **40**

II.5.2. Analyses microbiologiques **40**

II.5.2.1. Préparation des dilutions **40**

II.5.2.2. Recherche et dénombrement des germes de contamination **41**

II.5.2.2.1 Coliformes totaux (CT) et Coliformes fécaux (CF) **41**

II.5.2.2.2 Levures et moisissures **41**

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

III.1. Résultats de la validation de la pureté des souches lactiques **42**

III.2. Résultats de l'activité Protéolytique des souches lactiques testées **43**

III.3. Résultats d'évaluation de l'activité coagulante des extraits enzymatiques de LAB **45**

III.4. Évaluation de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques et du rapport AC/AP **47**

III.5. Résultats Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique **49**

III.6. Résultats d'Optimisation de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique de LAB **50**

III.6.1. Résultats de l'effet de la température sur l'activité coagulante **50**

III.6.2. Résultats de l'effet du pH sur l'activité coagulante **52**

III.6.3. Résultats du l' Effet du volume d'extrait enzymatique sur l'activité coagulante **53**

III.6.4. Résultats du l'effet de la concentration en chlorure de calcium sur l'activité coagulante **54**

III.7. Résultats des essais de préparation du fromage **57**

III.7.1. Résultats des analyses physico-chimiques **57**

III.7.2. Résultats des analyses microbiologiques **60**

Conclusion **64**

Référence bibliographique

Annexe

Introduction

La fabrication du fromage est un processus biotechnologique ancien, mais toujours en évolution, qui repose essentiellement sur la coagulation du lait. Traditionnellement, cette coagulation est assurée par la présure d'origine animale, riche en chymosine. Toutefois, la rareté croissante de cette ressource, associée à des préoccupations économiques, religieuses et éthiques, a conduit à une recherche active d'alternatives enzymatiques d'origine non animale **(Silva et al., 2024 ; Merheb-Dini et al., 2010)**. Parmi ces alternatives, les enzymes coagulantes microbiennes, en particulier celles produites par des bactéries lactiques (BL), suscitent un intérêt croissant.

Les bactéries lactiques représentent un groupe de micro-organismes gram-positifs, non sporulés, aux propriétés fermentaires bien connues. Présentes naturellement dans les milieux laitiers et végétaux, elles jouent un rôle central dans la transformation du lait en fromage, non seulement par acidification, mais aussi par leur capacité à produire des enzymes protéolytiques et coagulantes. Certaines souches, comme *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* ou *Lactiplantibacillus plantarum*, ont démontré leur aptitude à synthétiser des protéases capables de cliver spécifiquement la kappa-caséine, initiant ainsi la formation du caillé **(Kis et al., 2023 ; Di Cagno & Gobbetti, 2011)**. Les BAL contribuent également à l'aromatisation, à l'amélioration de la texture, ainsi qu'à la sécurité microbiologique des produits laitiers grâce à la production d'acides organiques et de peptides antimicrobiens. Les levains, généralement constitués de cultures pures ou mixtes cultivées sur lait écrémé, assurent une fermentation contrôlée et reproductible. L'utilisation de souches locales, isolées à partir de produits laitiers traditionnels, est particulièrement prometteuse : elles sont mieux adaptées à leur environnement, renforcent l'identité sensorielle des produits et participent à la valorisation du patrimoine local. Par exemple, **Bouchibane et al. (2022)** ont identifié plus de 250 souches issues de produits laitiers algériens. Plusieurs études récentes (**Kouadri Boudjelthia et al., 2023 ; Bouchibane et al., 2023, 2024**) ont souligné leur potentiel technologique. À l'échelle internationale, d'autres travaux **(Pisano et al., 2022, Kis et al., 2023)**ont confirmé leur efficacité dans la biopréservation et l'extension de la durée de conservation des aliments.L'utilisation d'extraits enzymatiques issus de souches lactiques offre plusieurs avantages : leur production est économique, leur spécificité d'action peut être optimisée, et leur innocuité est largement reconnue. De plus, leur application dans la fabrication fromagère contribue au développement de produits locaux valorisant des ressources microbiennes indigènes **(Díaz-Orozco et al., 2025).** Ces enzymes microbiennes peuvent être utilisées seules ou en combinaison avec des cultures lactiques actives, permettant

d'initier à la fois la coagulation enzymatique et la fermentation lactique, améliorant ainsi la texture, la sécurité microbiologique et les caractéristiques sensorielles du produit final. Dans ce contexte, le présent travail vise à évaluer la faisabilité de la fabrication d'un fromage en utilisant une enzyme coagulante extraite à partir de souches lactiques isolées localement. Deux modalités de coagulation ont été explorées : une coagulation enzymatique pure et une coagulation mixte, combinant l'enzyme extraite et la culture lactique comme levain. L'étude inclut également l'analyse comparative des propriétés physico-chimiques et microbiologiques des fromages obtenus. Ce mémoire s'articule en deux grandes parties : une première partie bibliographique consacrée aux enzymes coagulantes microbiennes, à la technologie fromagère, et au rôle des bactéries lactiques ; et une seconde partie expérimentale détaillant les protocoles d'extraction enzymatique, la fabrication du fromage, les analyses physico-chimiques et microbiologiques, et l'interprétation des résultats obtenus.

Chapitre I : Revue bibliographique

I. Bactéries Lactiques

I.1. Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes **(DE ROISSART, 1986).**Cette catégorie regroupe divers micro-organismes qui produisent de l'acide lactique comme principal produit final au cours de la fermentation des hydrates de carbone.**(Carr et al. , 2002).** possèdent souvent une forme en cocci ou en bacille , sont gram-positives, immobile , tolérantes à l'oxygène et négatives pour la catalase **(Fack et al. , 1995).** Elles ne forment pas de spores, manquent de cytochromes et fermentent le glucose, que ce soit de manière homo ou hétérofermentaire **(Axelsson, L. , 2004).**Ils ont une faible teneur molaire en guanine + cytosine (G + C) et elles peuvent être anaérobies facultatives ou microaérophiles **(Pringsulaka et al. , 2012).**Ces bactéries ont des propriétés protéolytiques, ne réduisent pas les nitrates en nitrites, sont négatifs à la gélatinase et ne peuvent pas utiliser le lactate, ne produisent ni indole ni hydrogène sulfuré et ne fermentent pas le glycérol**(Badis et al. , 2005).** les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens : *Lactobacillus, Leuconostoc, Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus, Pediococcus ,Bifidobacterium, Carnobacterium, Oenococcus,Weissella, Aerococcus, Tetragenococcus et Vagococcus.***(ZAROUR et al, 2013).**Ces micro-organismes sont capables de convertir certains sucres comme le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le saccharose et le lactose en acide lactique par fermentation **(KANDLER et WEISS, 1986).**

I.2. Origine et Habitat

Les bactéries lactiques (LAB) constituent un groupe bactérien ubiquitaire très répandu dans la nature, dans les niches d'origine laitière (fermentée), carnée et végétale, dans les tractus gastro-intestinal et urogénital de l'homme et de l'animal, ainsi que dans le sol et l'eau **(Ruiz Rodríguez et al.,2019).**De nombreuses espèces sont utilisées dans la production et la conservation d'aliments fermentés pour les animaux ainsi que pour des produits agricoles crus, où elles peuvent être présentes comme contaminants ou ajoutées intentionnellement pour influencer la fermentation. **(MAYO et al, 2010).**

- Les espèces du genre *Lactococcus* proviennent du lait ou des plantes. Il est significatif que la première culture pure d'une bactérie ait été *Lactococcus lactis*, obtenue par J. Lister en 1873,

ce qui a permis de l'identifier comme l'agent majeur responsable de l'acidification du lait caillé.**(Axelsson, L. , 2004).**

• Le genre *Lactobacilli* se retrouve dans des zones où les glucides sont présents, c'est-à-dire dans divers environnements comme les muqueuses humaines et animales (comme la bouche, les intestins et le vagin) et se localise dans le système digestif peu de temps après la naissance. On le trouve également sur les plantes et les matières d'origine végétale, dans le fumier, ainsi que dans des environnements artificiels tels que les eaux usées, lors de la fermentation ou de la décomposition des aliments. Plusieurs variétés de Lactobacillus mésophiles ont été isolées à partir de fromage, notamment *L. casei, L. paracasei, L. plantarum, L. rhamnosus et L. curvatus*. **(Bernardeau et al. , 2008).**

• *Streptococcus thermophilus*, qui appartient au genre *Streptococcus*, a été isolé à partir de lait pasteurisé, de produits laitiers et de levains faits maison**(Bekhouche, 2006).**

• Les espèces du genre *Leuconostoc* se trouvent dans le lait, les produits laitiers (comme le fromage, la crème et le beurre), les végétaux fermentés (comme la choucroute, fenouilsmarinés, haricots verts, betteraves, blettes, produits fermentés à base de tomates), les sirop de sucre.**(Devoyod et Poullain, 1988).**

I.3. Classification des bactéries lactiques

LAB est basée sur des traits phénotypique tels que leur morphologie, la manière dont elles ferments le glucose,leur croissance à différentes températu res, le type d'isomère d'acide lactique qu'elles génèrent et leur capacité à métaboliser divers hydrates de carbone **(De Roissart et Luquet, 1994 ; Holzapfel et al. , 2001)** la capacité à croître à des concentrations élevées de sel et la tolérance aux acides ou aux alcalins**(Axelsson, L. , 2004).**Ce système de classification a été élargi pour inclure des indicateurs chimiotaxonomiques, comme les acides gras présents dans les cellules, l'analyse des protéines dans les cellules entières et d'autres caractéristiques cellulaires. Pour obtenir une identification et un classement plus précis, il est essentiel de se baser sur des données génétiques. Plusieurs méthodes génétiques sont employées, telles que le séquençage de l'ADN ribosomal, le ribotypage, l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD), la répPCR pour les empreintes digitales, le polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP) et l'électrophorèse en gel pulsé (PFGE) sur un ADN chromosomique entièrement digéré **(Gevers, 2002).**

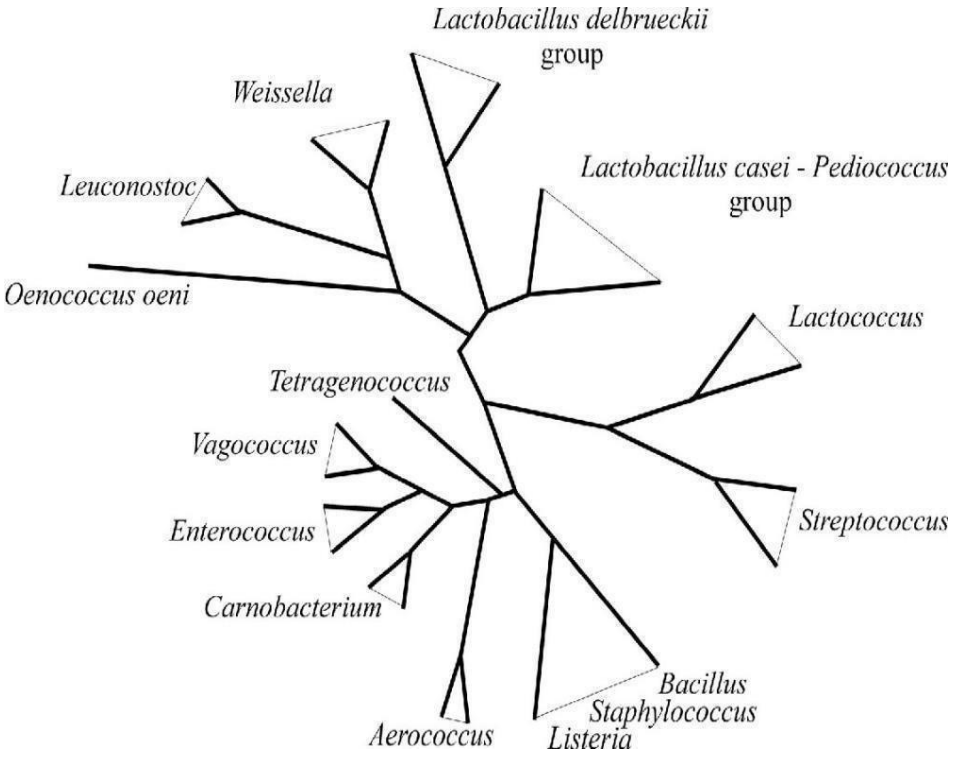


Figure 01 : Schéma montrant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques **(Axelsson, 2004)**

I.4. Lactobacilli

Ce groupe appartient à la famille des *Lactobacillaceae*.sont des cellules varient de longues tiges élancées, parfois courbées, à des coccobacilles courts, souvent corynéformes; la formation de chaînes est commune. Motilité rare; lorsqu'il y en a, par des flagelles péritrichiques. Non sporulant. Gram-positif.Elles ont un métabolisme de fermentation ils dégradent obligatoirement les sucres (saccharoclastique) pour produire de l'énergie, et au moins la moitie du produit final est du lactate, qui n'est généralement pas fermenté davantage. D'autres sous-produits possibles incluent l'acétate, l'éthanol, le CO_2, le formate et le succinate. Leur croissance peut se réaliser de manière facultative en milieu anaérobie. Leur température optimale pour la croissance se situe généralement entre 30 et 40°C.leur pH optimal habituellement 5,5 à 6,2 et c'est possible à un pH de 5,0 ; le taux de croissance est souvent réduit dans des conditions neutres ou initialement alcalines . aussi caractérisé par d'indole et de H2S , catalase négative . **(DE VOS et al. , 2009).**Ces bactéries sont divisées en trois groupes selon leur type de fermentation**(KANDLER et WEISS, 1986).**

Groupe I . <Thermobacterium>,sont thermophiles et homofermentatives. en grandissant à 45 °C ou plus, ne fermentant pas le ribose, ni hydrolysant l'arginine et ne grandissant pas à 15 °C**(Carr et al ,2002).**

Groupe II .<Streptobacterium>, qui se compose de Lactobacilles mésophiles et homofermentatives, forment du CO2 à partir de gluconate et non de glucose, et se développent de manière optimale à 15 °C **(Carr et al ,2002).**

Groupe III .<Betabacterium>,sont des hétérofermentaireset uniques aux autres Lactobacilli en ce sens qu'ils forment du dioxyde de carbone par fermentation du glucose, et hydrolysent la plupart de l'arginine en température 15°c . et fermentent le ribose, un pentose**(Carr et al ,2002).**

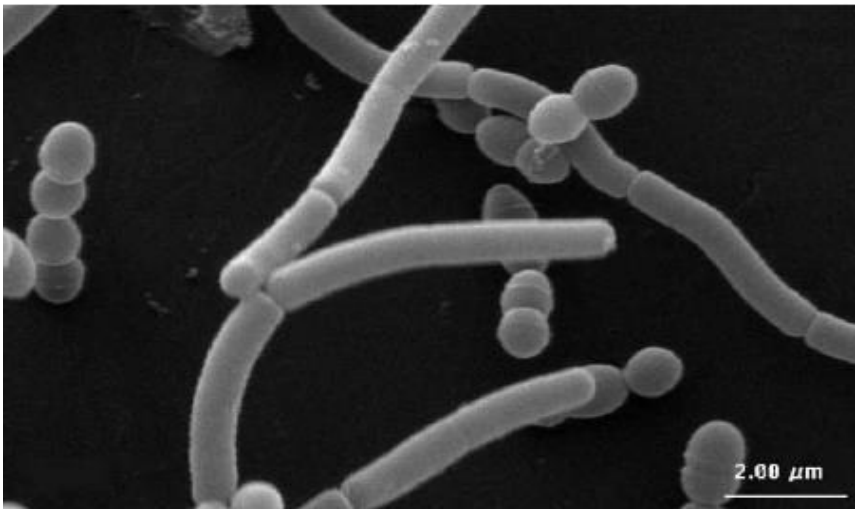


Figure 02 : Morphologie en microscopie électronique de Lactobacillus bulgaricus

(Paul, 2016).

I.5. Intérêt des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire

Les bactéries lactiques possèdent une diversité d'activités métaboliques et une aptitude à s'adapter à divers environnements. Cette variété est la raison de leur vaste champ d'application à l'échelle industrielle : Les bactéries lactiques jouent rôle dans coagulation du lait obtenue par des interventions combinées des enzymes coagulantes et des bactéries lactiques(principalement les lactocoques et/ou les leuconostocs pour les fromages à pâte molle ou à pâte pressée ; les streptocoques thermophiles et lactobacilles thermophiles pour les fromages à pâte pressée cuite). Ces bactéries ont pour fonction principale de réduire le pH du lait ou des caillés. Cela conduit à un caillot élastique bien cohésif, qui pourra être traité mécaniquement et thermiquement, favorisant une expulsion intense du sérum (synérèse). En revanche, un caillé lactique pur conduit à un coagulum déminéralisé et friable, dépourvu de cohésion, qui ne permet pas un traitement mécanique sans la perte de particules de caséine dans le sérum. **(Desmazeaud ,1996).** Ces bactéries possèdent un puissant mécanisme de dégradation des protéines qui leur donne la capacité d'utiliser les protéines contenues dans les peptides et les acides aminés du lait comme source d'azote. Ils participent à contribue au développement des saveurs et de la texture du fromage **(Baer et Casey. 1997) .** L'objectif de leur emploi est d'améliorer les propriétés organoleptiques des produits fermentés et de prolonger leur durée de conservation sans avoir recours à des conservateurs chimiques, grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles produisent. **(Dortu et Thonart, 2009).**

I.6. Effet des bactéries lactiques sur les propriétés organoleptiques du fromage

Les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans le développement des propriétés organoleptiques du fromage, notamment en influençant le goût, la texture et l'arôme. Leur action commence dès l'ensemencement du lait et se poursuit tout au long de l'affinage.

I.6.1. Développement de texture

L'impact du modificateur de pH sur la texture du fromage est particulièrement visible dans le camembert. Initialement, le caillé présente un pH de 4,6 à 4,7 et une texture ferme et friable. Durant l'affinage, la flore de surface (geotrichum et pénicillium) métabolise l'acide lactique, créant un gradient de pH entre la croûte et le centre, renforcé par la production d'ammoniac. En fin de maturation, le pH atteint environ 7,0 en surface et 5,5 ou plus au centre. Cette évolution modifie la charge des caséines et leur capacité à retenir l'eau, entraînant un ramollissement progressif du fromage, d'abord en périphérie puis vers le centre. Une section transversale révèle ainsi une zone externe plus uniforme et jaunâtre **(Law et Tamime, 2012).**

I.6.2. Développement de goût

les bactéries lactiques avec d'autre micro-organismes présents dans le fromage, tels que les levures et les moisissures, pour créer des synergies aromatiques complexes.

I.6.3. Développement d'arôme

les bactéries lactiques sont capables de générer une multitude de composés aromatiques, principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des lipides **(Corrieu et Luquet 2008).**

I.2. Enzymes Coagulantes

I.2.1. Définition des enzymes coagulantes

Les coagulants sont un des ingrédients les plus critiques dans la fabrication du fromage, car ils sont responsables de la transformation du lait liquide en caillé solide **(Souza, 2022).**utilisées dans le procédé de fabrication du fromage pour couper spécifiquement la k-caséine et initier la coagulation des micelles de caséine et la formation de caillé **(Vogel et al., 2019).** Ces enzymes présentent une structure tridimensionnelle bilobée, une taille comparable entre elles, et de nombreuses régions très conservées, ce qui reflète leur spécificité fonctionnelle . Par ailleurs, tous les coagulants connus sont plus ou moins inhibés par la pepstatine, un oligopéptide microbien produit par des souches de Streptomyces, ce qui confirme leur appartenance à la famille des endoprotéases aspartiques **(Aehle, 2007).**toutes les enzymes coagulantes de fromagerie sont des protéases à caractère acide dont l'activité optimals est généralement proche de ph 5.5**(Ramet, 1993).**

I.2.2. Historique des enzymes coagulantes

L'utilisation d'enzymes de coagulation du lait dans la fabrication du fromage constitue l'une des plus anciennes applications biotechnologiques connues de l'humanité, remontant à environ 8000 ans **(Kelly et al., 2021).** Les anciens Égyptiens sont souvent crédités de la découverte de la présure il y a 4000 à 5000 ans, tandis que les Grecs et les Romains reconnaissaient déjà la valeur du fromage dans leur alimentation **(Vogel et al., 2019).** Jusqu'au XIX^{e} siècle, la fabrication du fromage se faisait principalement dans les fermes, à l'aide d'extraits frais de caillette séchée (abomasa) ou, selon les cultures, à l'aide d'enzymes végétales issues du chardon *Cynaracardunculus***(Kelly et al., 2021).** Ce n'est qu'en 1874 que la première préparation commerciale standardisée de présure a été développée et commercialisée par l'entreprise danoise Chr. Hansen, marquant un tournant vers la production industrielle et contrôlée de coagulants fromagers **(Whitehurst& Van Oort, 2009).**

I.2.3. Types des enzymes coagulantes

il y a un grand nombre d'enzymes protéolytiques, d'origine animale, végétale ou microbienne, qui ont la propriété de coaguler le lait.**(Lapointe et Amiot ,2002).**

I.2.3.1. Enzymes d'origines animals

D'une manière générale, la présure est un ferment soluble présent dans des milieux biologiques variés du jeune ruminant soumis au régime lacté : la muqueuse stomacale et la tunique musculaire externe, mais aussi l'estomac des oiseaux et des poissons dans leur état de repos ou en germination. **(Houdet, 1924).** D'un point de vue biochimique, elle se présente

comme le produit d'un mélange de deux enzymes protéolytiques, la chymosine (80 %) et la pepsine (20 %), toutes deux capables de provoquer la coagulation du lait. Le caillé obtenu à l'aide de ce produit fini par bien se tenir (dans le cas des fromages à pâte pressée), sans s'effriter **(Brand et al., 2017).**

I.2.3.2 Enzymes d'origines végétales

La propriété coagulante du lait dans certains végétaux est connue depuis longtemps, elle provient d'une enzyme dont la nature paraît identique à celle du lab, enzyme coagulante présente dans l'estomac des mammifères**.(Christen et Virasoro.,1935).**Un certain nombre d'enzymes provenant des végétaux sont apparues comme des substituts potentiels des coagulants d'origine animale. C'est le cas de la cardosine extraite du cardon (*Cynara cardunculus*), de la ficine extrait du latex de figuier (Ficus carica), de la papaïne extraite des feuilles de papayer (Caricapapaya), de la broméline obtenue à partir des tiges d'ananas (Ananas comosus) et de la calotropine dérivée de Calotropis procera**(Souaré et al., 2017).**ces protéases végétales possèdent le pouvoir de coaguler le lait se trouvent dans les fruits, les feuilles et même dans les semences de beaucoup d'espèces de plantes. **(Poznanski et al.,1975)**Si la totalité des enzymes coagulantes identifiées appartiennent à la famille des protéases aspartiques, des enzymes appartenant aux familles des sérines-protéases et des cystéines-protéases ont également montré une activité coagulante **(Nitu et al., 2021).**

I.2.3.3. Enzymes d'origines microbienne

ces enzymes sont produites par divers micro-organismes, y compris des bactéries et des champignons **(Chávezet al .,2024)**

I.2.3.3.1. D'origine bacterienne

Les souches du genre Bacillus (*B. subtilis, B. cereus, B. polymyxa, B. coagulans*) ont déjà fait l'objet de recherches sur leur production de coagulases. Bien qu'elles aient un pouvoir coagulant plus fort que celui des enzymes végétales, il demeure inférieur à celui des enzymes fongiques. En outre, leur forte activité protéolytique donne des caillés rendus peu cohésifs par rapport à ceux rendus avec la présure animale. **Puhan et Irvine (1973)** notent que la qualité sensorielles des fromages obtenus avec la coagulase de *B. subtilis* est inférieure du fait d'une protéolyse excessive, partiellement contrée par une acidification préliminaire du lait. Pour autant, les enzymes microbiennes peuvent susciter un intérêt du fait de leur mise en oeuvre

rapide et en qualité sans agir sur une ressource première animale ou végétale. Les enzymes extracellulaires sont préférées du fait de la facilité de extraction.**(Talantikite-Kellil, S. 2015).**

I.2.3.3.2. D'origine fongiques

La protéase aspartique mise en œuvre par Rhizomucor miehei, le coagulant microbien le plus utilisé en production fromagère, est une enzyme thermolabile.Effectivement, plusieurs auteurs mentionnent que certaines protéases fongiques peuvent coaguler le lait, avec par exemple les protéines purifiées issues de *Mucor sp*. ou *Rhizomucorsp*. À ce titre, plusieurs protéases aspartiques d'origine fongique ont été purifiées et caractérisées telles que succédanés des présures. Les enzymes de type pepsine, notamment l'aspergillopepsine (*aspergillopepsine I*, EC 3.4.23.18) chez les espèces *d'Aspergillus*, et la *Rhizopus pepsine* (EC3.4.23.21) pour celles du genre *Rhizopus*, sont classées ici sous la même famille. Elles ont des masses moléculaires comprises entre 30 et 50 kDa et présentent sur le site actif des résidus d'acide aspartique conservés. D'autre part, **Da Silva et al. (2017)**, dans un premier travail d'analyse approfondie des propriétés biochimiques de la peptidase aspartique excrétée par le champignon Phanerochaete chrysosporium, ont également pu démontrer que cette coagulase peut avoir un potentiel d'application intéressant au regard la production fromagère.**(BOUMEDIENE, F. 2021).** Dans cette optique, et pour s'engager dans l'optique des conditions spécifiques du secteur de l'affinage, il paraît judicieux de considérer des micro-organismes déjà impliqués dans la maturation des fromages traditionnels. Ainsi, tout naturellement, d'un évitement vis-à-vis des espèces de départ, ont été prises en compte les moisissures *Pénicillium caseicola* et *Pénicillium roqueforti*, grâce à leur statut d'espèce clé dans l'affinage des fromages à pâte molle et des fromages à pâte persillée **(Lenoi et al., 1971).**

I.2.4. Role des enzymes coagulantes dans fabrication de fromage

Pour l'élaboration du fromage, le coagulant peut être d'origine animale, d'origine végétale ou d'origine microbienne. Deux fonctions sont remplies par le coagulant :

– coaguler le lait,

– dégrader les protéines du lait au cours de l'affinage ; il vient alors donner un goût piquant au lait. **(Ebing etRutgers, 2006).**

I.2.4.1 Coagulation enzymatique

Pour optimiser la digestion des protéines du lait, les jeunes ruminants (par exemple les veaux) sécrètent des enzymes protéolytiques qui réduisent la stabilité colloïdale des protéines du lactosérum (CM) et induisent la coagulation du lait dans l'estomac. La texture altérée du lait ralentit la vidange gastrique et le transport des protéines dans l'estomac. La coagulation enzymatique du lait est la première étape de la plupart des productions fromagères. Il s'agit d'un processus complexe impliquant i) l'hydrolyse des caséines k, ii) l'agrégation des (para-CM) ainsi obtenue, et iii) la formation et le vieillissement du gel enzymatique du lait. Ces trois étapes sont interconnectées et sont particulièrement sensibles aux modifications des conditions physico-chimiques du lait.**(Gagnaire et Croguennec ., 2025).**

I.2.5. Mécanisme d'action des enzymes coagulantes

Le mécanisme d'action de la chymosine est bien établi et comporte deux étapes:

•La première étape, enzymatique, correspond à l'attaque par l'enzyme des composants stabilisant les micelles. L'enzyme hydrolyse la caséine -k au niveau de la liaison phe105-met106 : la chaîne peptidique est ainsi coupée en deux fragments de longueurs inégales : le fragment l-105 est la paracaséine-k et le fragment 106-169 est le macropeptide de caséine (cmp). La paracaséine-k, liée aux caséines a et b, reste dans les micelles hydrophobes, tandis que le cmp, contenant tous les glucides, est libéré et pénètre dans le lactosérum. La libération du cmp réduit significativement la charge de la micelle et son niveau d'hydratation : deux facteurs de stabilité sont affectés.

•la deuxième phase, appelée agrégation, dont le mécanisme reste encore flou. Les micelles instables s'agrègent et forment des liaisons hydrophobes. Les ions calcium se lient aux parties chargées négativement des micelles, réduisant la répulsion électrostatique qu'elles subissent et favorisant leur agrégation. Cette phase est facilement observable par la formation de gels. Cependant, au moins 85 à 90 % de la κ-caséine doit être hydrolysée pour que cette phase d'agrégation puisse débuter. De plus, les sites d'agrégation des micelles ne sont pas répartis uniformément à la surface, mais très localisés, ce qui explique pourquoi la déstabilisation des micelles ne conduit pas à un précipité dense, mais à la formation d'un réseau protéique très lâche qui enveloppe toute la phase aqueuse. Le gel de chymosine est fortement minéralisé, ce qui entraîne une augmentation de sa cohésion et de sa fermeté.**(Lapointe et Amiot ,2002).**

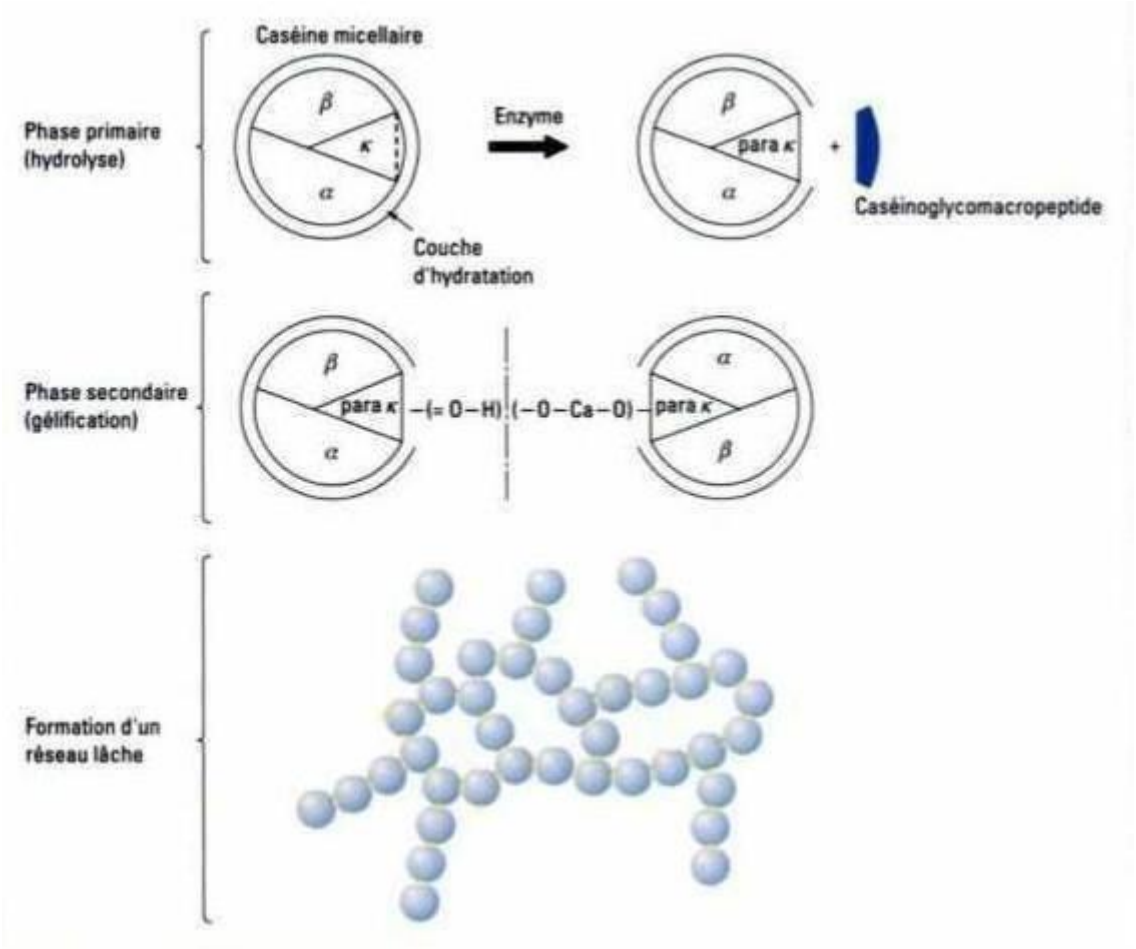


Figure 03: Mécanisme d'action de la présure

(Lapointe et Amiot ,2002).

I.2.6. Impact des enzymes coagulantes sur la qualité du fromage

En production fromagère, l'objectif principal est d'atteindre des valeurs cibles d'extrait sec afin de réguler les réactions de fermentation liées à la maturation du produit (lipolyse et protéolyse). La gestion du drainage est directement liée à l'acidification pendant la production. L'influence de la fermentation sur la qualité du produit est donc significative. Les fournisseurs de ferments lactiques industriels maîtrisent parfaitement ce phénomène et proposent désormais des combinaisons de ferments lactiques spécifiques pour des procédés spécifiques afin d'obtenir la cinétique d'acidification souhaitée.**(Branger et al., 2007).**

La présure, outre sa fonction coagulante, influence également la consistance et l'élasticité du fromage. Le choix de la présure et sa concentration orientation la rétention de calcium au sein du caillé, ce qui conditionne la texture du produit. En plus de structurer le fromage, la présure peut également interférer avec sa digestibilité. Les fromages élaborés à partir de présure

végétale, comme les fromages traditionnels issus du cardon que l'on trouve sur la péninsule ibérique, sont généralement plus souples en texture et amers en bouche, saveur qui évolue en cours de maturation.**(Souza .,2023).** Il a été mis en évidence que les enzymes impliquées, et là encore la chymosine, sont bien les agents intervenant sur la caséine k mais également sur les caséines αsl B et ce qui contribue directement, au cours de l'affinage, à la protéolyse du fromage et, par conséquent, peut avoir un impact non négligeable sur les propriétés organoleptiques finales du produit. La pepsine bovine, à faibles niveaux, est bénéfique à l'hydrolyse des caséines et donc à la qualité des fromages affinés.**(Collin .,2015).**

I.3. Fromage

I.3.1.Définition de fromage

Le fromage est le produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou semi-dure, dure ou extra-dure qui peut être enrobé et dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine ne dépasse pas celui du lait, et qui est obtenu:**(CODEX STANDARD 283-1978)**

(a) par la coagulation du lait, qu'il soit entier, écrémé ou partiellement écrémé, ainsi que de la crème du lactosérum ou babeurre, seul ou en mélange, grâce à l'utilisation de présure ou d'autres agents coagulants appropriés, et le drainage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation

(b) par l'application de méthodes de production qui induisent la coagulation du lait et/ou des substances dérivées du lait, présentant des caractéristiques physiques, chimiques et organoleptiques similaires à celles mentionnées précédemment.

- Le fromage affiné est un fromage qui n'est pas prêt à la consommation peu après sa fabrication, mais qui doit être maintenu pendant un certain temps à la température et dans les conditions nécessaires pour que s'opèrent les changements biochimiques et physiques caractéristiques du fromage.

- Le fromage affiné aux moisissures est un fromage affiné où l'affinage est provoqué essentiellement par la prolifération de moisissures caractéristiques, dans la masse et/ou sur la surface du fromage.

- Le fromage non affiné dont le fromage frais est un fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après sa fabrication.

I.3.2. Dénomination et appellation

D'origine certains fromages portent des noms protégés par la loi en raison de leur origine.L'appellation d'origine pour un fromage met en avant son terroir (en France) ou sa typicité (en Italie), affirmant que l'unicité de chaque aliment traditionnel résulte d'une interaction sophistiquée entre le sol, la flore et le climat. Cela inclut également les techniques de production traditionnelles et les ingrédients une association qui ne peut être reproduite ailleurs.De nombreux pays disposent de leur propre système, tel que l'AOC pour la France (appellation d'origine contrôlée) et la DOC pour l'Italie (denominazione di origine controllata). L'Union européenne a également instauré l'IGP (indication géographique Protégée , utilisée pour les produits alimentaires et les vins traditionnels régionaux (Harbutt.,2010).

I.3.3- Historique de la fabrication du fromage à travers les âges

On croit que le fromage a évolué dans le « croissant fertile » entre le Tigre et Les rivières de l'Euphratre, en Irak, il y a environ 8000 ans, pendant la « révolution agricole » **(Fox et al., 2017)** racontant qu'un voyageur portait du lait dans une poche,et la poche était simplement une estomac de mouton. Après un moment, le voyageur s'est arrêté pour prendre pour boire et a découvert que le lait s'était séparé en un solide blanc tendre et un solide jaunâtre liquide. Il a goûté le solide et a trouvé qu'il avait un goût est agréable**(Tunick ., 2014).**

I.3.4-Types de fromages

I341. Fromage à pâte frais

Le fromage à pâte fraîche est caractérisé par un processus de coagulation acide, favorisé par l'ajout de levains mésophiles et un contrôle strict de la température (18 à 25°C). La pression et les doses de présure utilisées sont limitées pour maintenir la fermeté et la friabilité du caillé. Ce processus est lent, prenant entre 6 et 48 heures. L'égouttage du fromage est crucial mais incomplet, car le fromage frais a une faible teneur en matière sèche et une minéralisation limitée. Les méthodes traditionnelles d'égouttage peuvent durer jusqu'à 36 heures, alors que les méthodes modernes permettent un égouttage plus rapide grâce à la centrifugation. Le fromage frais, qui n'est pas affiné, doit être consommé rapidement après son égouttage et son conditionnement en raison de sa haute teneur en eau et de sa faible conservation (quelques jours) **(Ramet ., 1993).**On compte parmi ces produits les fromages blancs, petits suisses, double crème, carré frais, ainsi que ceux à demi-sel.



Figure 04 : Fromage frais de type ricotta

(https://hainaut-terredegouts.be/produit/la-ricotta-2/)

I.3.4.2. Fromage à pâte molle

Le fromage à pâte molle se caractérise par une coagulation mixte utilisant à la fois de la présure et des ferments lactiques mésophiles, sous des températures de 32 à 38°C. La coagulation produit un caillé de friabilité et contractibilité moyennes, avec une bonne perméabilité liée à l'acidification. La pâte obtenue a un extrait sec moyen (45 à 55 %) et un faible degré de minéralisation (0,2 à 0,3 % de calcium). L'affinage, qui dure de 15 jours à 2 mois, est influencé par la teneur en eau et l'activité enzymatique. On distingue trois types de pâtes molles selon la flore dominante : pâte fleurie (*Pénicillium camemberti*), pâte lavée (*Brevibacterium linens*), et pâte persillée (*Pénicillium roquefortii*).**(Ramet ., 1993).** Comme camembert , le munster , le brie.

I.3.4.3. fromages à croûte fleurie

Le caillé est déposé dans des moules troués. Après quelques heures, il est assaisonné, historiquement par saupoudrage à la main, mais le plus souvent par saumurage. Il est par la suite semé en surface de *pénicillium*, suite à un retournement préalable. Dans une cave, la circulation de l'air favorise la croissance de moisissures qui confèrent à la croûte un aspect

blanc, plus ou moins accentué de rouge. **(Chast et Voy ., 1984).**

I.3.4.4. fromages à croûte lavée

Sans pression, le caillé est brisé sur des paillons ou des caillebotis et placé dans des moules troués, ce qui favorise l'égouttage. Dans une cave d'affinage, pour préserver l'humidité extérieure et prévenir les marques de moisissures, on nettoie la croûte avec un tissu humide, en surface, deux ou trois fois chaque semaine, afin de la conserver.**(Chast et Voy ., 1984).**



Figure 05: Camembert à croûte fleurie

(https://www.ledauphine.com/magazine-cuisine-et-vins/2022/05/06/tout-savoir-sur-le-camembert-de-normandie)

I.3.4.5. Fromage à pâte pressée

Les fromages à pâte pressée et dure se distinguent par une coagulation dominée par l'action de la présure, avec des doses élevées (20 à 40 ml/100 l) et un faible ajout de levains mésophiles ou thermophiles. Le temps de floculation est court (10 à 30 minutes), formant un caillé avec une bonne aptitude à l'égouttage. Le fromage présente un extrait sec élevé (45 à 70 %), obtenu grâce à des traitements physiques et une acidification modérée, menant à une pâte très minéralisée (1,2 à 1,8 % de Ca). L'égouttage prend environ 20 heures, suivi d'un affinage long (3 semaines à 6 mois). L'affinage favorise la neutralisation chimique et enzymatique de la pâte, ainsi que la formation de gaz propioniques, caractéristiques des fromages tels que le gruyère et l'emmental. **(Ramet ., 1993).**

I.3.4.6. Pâtes pressées non cuites

Sont majoritairement fabriquées avec du lait de vache, à l'exception de l'Ossau-Iraty, issu de lait de brebis. Le processus comprend un caillage à la présure, un découpage et un brassage du caillé, suivi d'un égouttage rapide sous presse. Après un salage en cave tiède, l'affinage se poursuit en cave humide avec des soins réguliers (brossage, retournement). Ces fromages, comme le Cantal, le Morbier ou le Saint-Nectaire, ont une bonne conservation et peuvent être consommés à différents stades de maturation. Leur croûte peut être naturelle ou recouverte de cire ou de paraffine. **(Delpal .,2003).**

I.3.4.7. Pâtes pressées cuites

Sont issues d'un caillage chauffé à plus de 50 °C, ce qui les déshydrate fortement. Le caillé est ensuite moulé, pressé et affiné pendant plusieurs mois, voire un an. Une fermentation propionique crée des bulles et des fissures, apportant un goût légèrement piquant. Ces fromages, principalement montagnards, comme le Comté, le Beaufort ou l'Emmental français, se distinguent par leur longue conservation et leur texture ferme. **(Delpal .,2003).**



Figure 06 : Fromage à croûte lavée type Munster

(https://www.saveurs-magazine.fr/conseils/munster-un-fromage-costaud-au-coeur-tendre/)

I.3.4.8. Fromage à pâte persillée

On parle généralement de fromages produits à partir de lait de Vache, mais une exception notable existe : le roquefort est exclusivement fait à base de lait de brebis. Dans certains cas, la coagulation présure est courante (comme pour les bleus « doux », tels que ceux de Bresse et de Gex) ; alors que dans d'autres, la coagulation dominante lactique est privilégiée (pour les bleus « forts », comme ceux d'Auvergne et des Causses). Le caillé, qui s'égoutte de manière naturelle, est inoculé avec des spores de pénicillium qui produisent les traits et marbrures bleuâtres ou bleu-vert : Des moisissures se propagent à travers de minces tunnels créés avec de longues aiguilles. Le processus d'affinage en deux étapes (commençant par un hâloir, suivi d'une cave fraîche et humide) prend assez de temps : Pour le bleu d'Auvergne, la maturation est d'au moins quatre semaines et peut aller jusqu'à trois mois.**(Delpal .,2003).**



Figure 07: Fromages à pâte persillée type Roquefort

(https://cuisine.journaldesfemmes.fr/encyclopedie-produits/1956453-roquefort/)

I.3.4.9. Fromage parfumés

Les fromages parfumés se divisent en quatre catégories, incluant les fumés naturels et ceux aromatisés avec divers ingrédients ajoutés, tels que des herbes ou des fruits. Parmi eux, le Yarg Cornish cheese, enveloppé d'orties, a une saveur subtile, tandis que le Wensleydale aux canneberges, un fromage jeune et pressé, est mélangé à des fruits secs et sucrés. Le Taramundi, un fromage espagnol traditionnel, contient des noix concassées, offrant une texture demi-molle. Ces fromages aromatisés peuvent être reconstitués ou directement infusés avec des éléments aromatiques. **(Harbutt ., 2010).**

I.3.5. Compositions de fromage

Le fromage est généralement considéré par les consommateurs comme un Aliments riches en nutriments et une bonne source de protéines, de vitamines, minéraux, graisses et autres nutriments **(Bytyçi et a l., 2025) .**

I.3.5.1. Lipides

La teneur en lipides des fromages varie considérablement selon le type de lait utilisé, certains d'entre eux étant élaborés à partir de lait riche en crème tandis que d'autres sont fabriqués avec du lait partiellement ou entièrement écrémé. Le fromage est essentiellement constitué de triglycérides et, semblable au lait, il contient approximativement 80 mg de cholestérol pour 100 g. Une fraction des lipides se transforme en acides gras et en cétones.**(Fredot., 2006).**

I.3.5.2 Glucides

Lors de la coagulation (pour les fromages frais et à pâte molle) ou de l'affinage, presque tout le lactose est converti en acide lactique, ou est retiré avec le lactosérum lors de l'égouttage. Donc, le taux de lactose est :

- 3,5 % pour les fromages frais non sucrés.

- approximativement 18% pour le fromage frais sucré ou fruité. **(Fredot., 2006).**

I.3.5.3. Vitamines

Les fromages, notamment ceux contenant des moisissures à l'intérieur, peuvent contenir jusqu'à quatre fois plus de vitamines B (en particulier B_2, B_6 et PP) que le lait. Les vitamines hydrosolubles telles que celles du complexe B et la vitamine C sont en partie retirées avec le

lactosérum, mais leur concentration demeure relativement proche de celle présente dans le lait, sauf pour la vitamine B_{12} dont la teneur est inférieure (2 µg/100 g). Une portion de 40 g de fromage peut représenter près de 30 % des apports quotidiens conseillés en vitamine B_{12}.**(Fredot., 2006).**

I.3.5.4 .Minéraux

Les éléments minéraux du fromage représentent le facteur nutritionnel le plus intéressant. La teneur en calcium et en phosphore est supérieure à celle du lait : dix fois plus élevée dans les fromages à pâte dure et quatre à cinq fois plus élevée dans les fromages à pâte molle. Seuls le fromage frais et le fromage blanc contiennent des quantités comparables à celles du lait. Les fromages riches en matières grasses contiennent relativement moins de calcium et de phosphore.**(FAO .,1995)**.

Tableau 01 : Composition en certains nutriments de différentes variétés de fromages (pour 100 g de fromage ou en pourcentage de la matière sèche)**(FAO .,1995)**.

Variétés	**Protéines (g)**	**Matièregrasse (g)**	**Matièregrasse (%)**	**Calcium (g)**	**Phosphore (g)**	**Sodium (g)**
Parmesan	36,5	26,0	–	13,0	8,5	2,1
Emmenthal	27,9	29,2	45	10,8	8,6	0,6
Tilsit	26,0	27,7	45	8,0	5,3	1,3
Cheddar	25,4	32,4	50	8,0	5,0	1,7
Edam	25,5	26,0	45	7,5	4,5	2,1
Gouda	25,4	29,0	45	8,2	4,4	2,1
Butter cheese	21,1	29,0	50	6,9	4,2	2,1
Bleu	22,4	29,0	50	7,0	4,9	2,1
Brie	22,4	23,0	50	4,0	4,0	2,1

Variétés	Protéines (g)	Matièregrasse (g)	Matièregrasse (%)	Calcium (g)	Phosphore (g)	Sodium (g)
Camembert	22,0	22,3	45	4,0	4,0	1,6
Limbourg	22,4	19,7	40	5,7	3,0	–
Romadour	23,2	–	30	5,1	3,0	–
Fêta	17,8	18,8	40	6,5	4,0	46
Cottage cheese	14,7	4,6	20	0,8	1,6	0,8
Fromage blanc	11,8	11,8	40	0,7	1,5	–
Fromagemaigre	16,3	–	–	0,9	1,9	–

I.3.6- Procédés généraux de fabrication du fromage

Les techniques et les équipements utilisés pour la production de fromage diffèrent d'un fabricant à l'autre, cependant, les principes fondamentaux n'ont pas évolué depuis des milliers d'années. **(Harbutt ., 2010).**

I.3.6.1 Lait

est directement transporté de la salle de traite à l'usine de production de produits laitiers, où il subit des contrôles et des analyses pour garantir sa qualité et son hygiène. À ce stade, il peut être pasteurisé, habituellement à une température de 73 °C pendant une durée de 15 secondes. Puis, le lait est déplacé dans un récipient et chauffé. jusqu'à atteindre le degré d'acidité nécessaire : cela dépend du type de fromage à produire. **(Harbutt ., 2010).**

I.3.6.2 Caillage ou la coagulation

Lorsque l'acidité désirée est atteinte, on incorpore un mélange particulier de bactéries nommé ferment lactique. Ainsi, le lactose (les glucides présents dans le lait) se métamorphose en acide lactique et contribue à la saveur, à l'arôme et à la consistance du fromage. (Un niveau

d'acidité trop élevé ou trop bas produira des fromages défectueux.) La majorité des fromages sont fabriqués en ajoutant de la présure (extrait de l'estomac d'un animal nourri au lait et non sevré) ou un autre agent coagulant afin d'assurer que les associations entre les protéines et les graisses contenues dans le lait soient préservées : dans le lactosérum (ou petit-lait). C'est l'étape cruciale dans la production de fromage, car le degré de coagulation a un impact direct sur la rapidité de la fermentation. **(Harbutt ., 2010).**

I.3.6.3 .Égouttage

le processus de séparation du caillé du petit-lait. Tout juste formé, le caillé a l'apparence d'une gelée blanche, tandis que le lactosérum apparaît comme un liquide de couleur jaune-vert. Si on procède à une séparation délicate de ces deux éléments, on obtient des fromages relativement humides et flexibles, alors que la coupe du caillé provoque une évaporation plus importante du lactosérum, produisant ainsi des fromages de consistance plus ferme. Plus les morceaux seront réduits, plus le fromage obtenu sera ferme et de texture fine. Une fois l'acidité désirée obtenue, le lactosérum est éliminé. **(Harbutt ., 2010).**

I.3.6.4 Processus de moulage et de salage

Le caillé est ensuite déposé dans des moules ou des cercles et peut être pressé avant d'être retiré. Après avoir été sorti, le fromage est soit frotté ou saupoudré de sel, soit immergé dans de la saumure avant d'être disposé dans une chambre froide ou un hâloir pour son affinage. **(Harbutt ., 2010).**

I.3.6.5 .Affinage

c'est ici l'apogée de l'art de la production fromagère. C'est à ce moment que le caractère du lait et les saveurs singulières issues des pâturages vont se préciser. Un affineur compétent, celui qui gère la maturation des fromages, peut faire ressortir toutes les subtilités de saveur d'un fromage même le plus ordinaire. Les produits artisanaux évoluent constamment, en fonction du pâturage, de la saison et des conditions : dans la cave et par le fromager lui-même ; ainsi, à l'inverse du vin, chaque jour apporte une nouvelle cuvée de fromage, c'est ce qui lui confère son caractère exceptionnel et sublime. **(Harbutt ., 2010).**

I.3.7-Caractères physique qui influencer fromage

I.3.7.1. Humidité (teneur en eau)

L'humidité joue un rôle essentiel dans le processus d'affinage du fromage en affectant la texture, la saveur et la maturité globale du produit. Une humidité suffisante est essentielle pour éviter que le fromage ne perde de l'eau, ce qui peut entraîner une perte de poids (également appelée « rétrécissement ») et une perte de substances telles que les acides gras et les substances azotées. De plus, l'humidité affecte le développement de la microflore à la surface du fromage, essentielle pour un affinage uniforme et pour éviter les problèmes de séchage. Les transformations enzymatiques qui déterminent les caractéristiques sensorielles du fromage, telles que la protéolyse et la lipolyse, dépendent également des conditions d'humidité. Par conséquent, une surveillance stricte de l'humidité et un contrôle des autres paramètres environnementaux sont cruciaux pour garantir la qualité du fromage fini **(Lefrileux et al ., 2016).**

I.3.7.2. pH

Le pH joue un rôle clé dans l'élaboration du Gruyère AOC en affectant l'acidification du caillé, la dissolution du calcium et la texture du fromage. Il est essentiel pour convertir le lactose en acide lactique, contribuant ainsi à la sécurité alimentaire et à la prévention des bactéries nocives. Une surveillance précise du pH peut ajuster le processus de production pour garantir la qualité du produit, tout en affectant également son arôme et son goût. L'utilisation d'un pH-mètre garantit des mesures fiables prenant en compte les changements de température et les conditions environnementales.**(Häni et Jakob., 2006).**

I.3.7.3. Teneur en sel

affecte l'activité enzymatique du fromage en affectant le coagulant. De faibles concentrations de sel peuvent stimuler ces réactions enzymatiques, tandis que l'ajout de grandes quantités peut réduire l'activité de l'eau et retarder ou inhiber les enzymes. De plus, le sel modifie la structure des substrats comme la caséine, empêchant la libération de certains peptides au goût amer en masquant les segments hydrophobes de la β-caséine **(Fox et Walley, 1971).**

.

.

Chapitre II: Matériels et Méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Lieu et objectif

L'étude a été menée entre mars et mai 2025 au laboratoire pédagogique de microbiologie de l'Université Yahia Farès de Médéa. Elle vise à évaluer la faisabilité de la fabrication d'un fromage en utilisant une enzyme coagulante extraite à partir de souches lactiques isolées localement. Notre objectif vise également à démontrer l'intérêt des extraits enzymatiques d'origine microbienne comme alternative potentielle à la présure commerciale, en mettant en œuvre deux types de coagulation une coagulation enzymatiques et une coagulation mixte combinant l'extrait protéasique issu des mêmes souches lactiques et leurs cultures lactiques en tant que levains, puis analyser les propriétés physico-chimiques et microbiologiques des fromages préparés

II.2. Matériel

II.2.1 Matériel biologique

Au cours de cette étude, 8 souches de bactéries lactiques isolées localement (Tableau 02) ont été employées. Les différentes souches ont été isolées, purifiées et identifiées à l'aide d'une méthode moléculaire (Spectrométrie de masse MALDI-TOF MS) et d'une méthode génétique (séquençage de l'ARN 16S) par notre Encadreur Docteur BOUCHIBANE Malika. **(Bouchibane et *al*., 2022)** ; **(Bouchibane et *al*., 2023).**

Tableau 02: Les espèces des souches testées.

Code des souches	Identification
BLBM O	*Limosilactobacillus fermentum*
BLBM D'	
BLBM S	
BLBM 106	*Lactiplantibacillus plantarum*
BLBM J	
BLBM S13	
BLBM AB	*Apilactobacillus kunkeei*
BLBM D	

II.2.2 Matériel non biologique

Milieux de culture et Appareillage (Annexe 01).

II.3. Méthodes

II.3.1. Revivification des souches

Les souches lactiques sélectionnées préalablement conservées dans le glycérol sont revivifiées par deux repiquages sur les bouillons MRS à une température de 37°C pendant une période de 24 heures.

II.3.2. Vérification de la pureté des souches lactiques

La pureté des souches lactiques a été vérifiée en utilisant un ensemencement en strie sur la gélose MRS, puis elles ont été incubées à 37°C pendant 48 à 72 heures en anaérobiose. Pour confirmer leur pureté, un test de catalase ainsi qu'un examen macroscopique et microscopique ont été effectués. **(Saidi, Y. 2020).**

II.3.2. 1.Test de catalase

La catalase est détectée par l'émulsion de la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. La présence d'un dégagement de gaz témoigne de la décomposition de l'eau oxygénée par l'enzyme à tester.

II.3.2. 2.Analyse macroscopique

L'analyse macroscopique a été réalisée en examinant la taille, la forme et la couleur des colonies présentes sur les géloses, ainsi qu'en observant un problème sur les bouillons.

II.3.2. 3.Analyse microscopique

Les colonies ont été examinées microscopiquement en utilisant la coloration de Gram afin de déterminer le type de Gram, leurs morphologies et leur mode de regroupement.

La coloration de Gram a été faite selon la technique suivante :

L'utilisation du colorant violet de gentiane permet de colorer l'intérieur des bactéries. Quelques gouttes ont été appliquées sur un frotti fixé et laissées pendant une minute. Après avoir rincé avec de l'eau distillée, quelques gouttes de la solution Lugol ont été appliquées et laissées pendant 30 secondes plus tard. Ensuite, on les décolore à l'alcool à 90o et on les rince à l'eau distillée. Selon. Pour visualiser les bactéries Gram (-), on recolore avec de la fuchsine de Ziehl (rose) ont été versées sur la lame et laissées pendant 30 secondes. La couleur des bactéries à Gram positif est violette, tandis que celle des bactéries à Gram négatif est rose.**(Larpent et Larpent, 1990).**

II.3.2. 4. Conservation des souches

Chaque espèce a été soumise à une conservation à longue durée en tube Eppendorf à une température de -20 C°, en utilisant le bouillon MRS d'une culture de 18 heures, avec une addition de 30% de glycérol. **(Samelis et *al*., 1994).**

II.3.3. Mise en évidence de l'activité Protéolytique

Cette activité correspond à la capacité des enzymes, notamment les protéases et les peptidases, à hydrolyser les protéines en peptides ou en acides aminés. Chez les bactéries lactiques, elle joue un rôle clé dans la dégradation de la caséine du lait, favorisant ainsi leur croissance, la maturation du fromage et le développement des arômes **(Kujiji et al., 1996).**

Nous avons évalué l'activité protéolytique des souches afin de sélectionner celles présentant un bon potentiel. Pour cela, 10 µL d'une culture de nuit de chaque souche ont été ensemencés par contact ponctuel sur des milieux PCA, YMA et MRS enrichis à 10 % de lait écrémé stérile. Après incubation à 37 °C pendant 24 à 48 heures, des halos transparents ou opaques autour des points d'inoculation ont été observés et mesurés, indiquant une activité protéolytique **Ben Zineb, M. et al. (2023)** ,**(Karakas-Sen et Karakas, 2018)**. Le pouvoir des souches à hydrolyser les caséines a ensuite été confirmé en milieu liquide, un volume de 100 µL d'une culture fraîche des souches préalablement testées sur gélose a été ensemencé dans un bouillon MRS sans peptone, enrichi à 10 % de caséine. L'hydrolyse des caséines a été mise en évidence après 24 heures d'incubation par la formation d'un coagulum dans le milieu. **(Bouchibane , M ., 2022).**

II.3.4. Protocole d'obtention des extraits enzymatiques à partir de bactéries lactiques

II.3.4.1. Préparation du milieu de culture et mise en fermentation

Le milieu de culture utilisé pour la fermentation est un substrat semi-solide à base de son de blé, sélectionné selon les recommandations de **Rao et Mathur (1975)**, **John et coll. (2006)** avec une légère modification consistant en l'ajout de fenugrec. Ce dernier est connu pour son effet favorable sur la production de protéases extracellulaires. La formulation finale du milieu comprend 25 g/L de son de blé, 25 g/L de fenugrec, 3 g/L d'extrait de levure, 4 g/L de glucose, 2 g/L de caséine, et 3 g/L de phosphate disodique (Na_2HPO_4).

Pour la préparation, les différents composants sont pesés puis répartis dans des erlenmeyers de 250 mL contenant chacun 50 mL d'eau distillée. Ainsi, chaque flacon reçoit 2,5 g de son de blé, 2,5 g de fenugrec, 0,2 g de glucose, 0,1 g de caséine, 0,1 g de phosphate disodique et 2,5 g d'extrait de levure. Les erlenmeyers sont ensuite fermés hermétiquement à l'aide de coton cardé, recouvert de gaze et d'une feuille d'aluminium, avant d'être stérilisés à 120 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement des milieux, chaque flacon est inoculé avec 3 mL d'un inoculum préparé à partir d'une culture fraîche de bactéries lactiques. Cette culture est ajustée à une densité optique (DO) comprise entre 0,08 et 0,1, mesurée à une longueur d'onde de 620 nm. L'incubation des cultures est réalisée à 37 °C pendant une durée de 24 heures, sous agitation modérée à 110 tours par minute, conformément au protocole établi par **Poza et al. (2003), Spaggiari et coll. (2024)**



Figure 08: fermentation au milieu semi-solide de son de blé+fenugrec

II.3.4.2. Récupération des enzymes extracellulaires post-fermentation

À l'issue de la période d'incubation de 24 heures, les cultures sont soumises à une étape de séparation pour extraire les enzymes extracellulaires produites par les bactéries lactiques. Le contenu de chaque erlenmeyer est d'abord filtré à travers une double couche de gaze stérile afin de retirer les résidus solides du substrat fermenté. Le filtrat obtenu constitue le surnageant brut contenant les enzymes solubles. Ce surnageant est ensuite centrifugé à 8 000 tours par minute pendant 15 minutes à 4 °C, dans le but de clarifier l'extrait enzymatique et d'éliminer les éventuelles cellules résiduelles ou particules non solubles. Le liquide surnageant post-centrifugation est soigneusement recueilli et conservé à 4 °C pour des analyses enzymatiques ultérieures. Ce liquide constitue l'extrait enzymatique extracellulaire brut, prêt à être utilisé pour la caractérisation de l'activité protéasique ou pour des essais de préparation du fromage. **Banerjee, R. (2006).**

II.3.4.3. Évaluation de l'activité coagulante des extraits enzymatiques de bactéries lactiques

L'activité coagulante (AC) des extraits enzymatiques issus de bactéries lactiques a été évaluée selon le protocole de **Berridge (1952)**, adapté par **Arenas et al. (2016) , Adesokan, I.A. et al. (2024)** et **Shieh et al. (2009),** avec quelques modifications. Un substrat de lait a été préparé en dissolvant 12 g de lait écrémé en poudre et 0,11 g de chlorure de calcium ($CaCl_2$) dans 100 ml d'eau distillée. Ce mélange a été préchauffé à 35 °C au bain-marie pendant 40 minutes, avant d'y ajouter 1 ml d'extrait enzymatique à 10 ml de substrat pour initier le test. L'apparition des premiers flocons a été observée visuellement, marquant le début de la coagulation. L'activité coagulante a ensuite été calculée en unités **Soxhlet (US)** à l'aide de la formule :

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

où *F (US)* est la force coagulante, *V* le volume de lait (10 ml), *T* le temps de coagulation (en secondes), et *v* le volume d'extrait enzymatique utilisé (1 ml). Le facteur 2400 représente la durée standard du test (40 minutes, soit 2400 secondes).

En complément, l'activité a également été exprimée en unités présure (UP) à l'aide de la formule :

$$\mathbf{UP = (10 \times V) / (T \times Q)}$$

avec *Q* correspondant au volume d'enzyme. La relation entre ces deux unités est donnée par :

$$\mathbf{F\ (US) = UP / 0{,}0045}.$$

Cette méthode permet de quantifier avec précision le potentiel coagulant des enzymes extracellulaires produites par les bactéries lactiques**,** notamment dans des applications technologiques telles que la fabrication de fromage.

II.3.4.4. Évaluation de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques et du rapport AC/AP

L'activité protéolytique (AP) des extraits enzymatiques des espèces lactiques a été mesurée selon les protocoles de **Silva & Shih, Siboukeur, Mati & Hessas (2005), ainsi que de Shieh, Phan Thi & Shih (2009), Jasna Novak et al. (2022).** Le test repose sur la capacité de l'enzyme à hydrolyser la caséine : un mélange réactionnel est constitué de 0,4 ml de tampon acétate 0,2 M (pH 5,5) et 0,2 ml d'extrait enzymatique**,** incubé à 35 °C pendant 30 minutes**,** puis stoppé par l'ajout de 1 ml de TCA à 10 %**.** Après centrifugation, le surnageant réagit avec le réactif de Folin–Ciocalteu, développant une couleur bleue liée aux acides aminés libres (notamment la tyrosine). La densité optique est mesurée à 660 nm, puis comparée à une courbe étalon de BSA pour quantifier les protéines libérées, exprimant ainsi l'activité protéolytique en UE/ml. Par ailleurs, le rapport AC/AP est calculé selon **Abdel-Fattah et al. (1974) et Abdelrahman et al. (1990)**, afin d'évaluer la prédominance de l'activité coagulante vis-à-vis de l'activité protéolytique :

$$\boldsymbol{Indice\ AC/AP = \frac{Activité\ Coagulante\ (AC)}{Activité\ Protéolytique\ (AP)}}$$

II.3.4.4.1. Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique

La quantification des protéines dans l'extrait enzymatique brut (EEB) a été réalisée selon la méthode classique de **Lowry et al. (1951)**. Le protocole utilise un réactif alcalin à base de cuivre, suivi du réactif Folin–Ciocalteu. Après incubation, l'échantillon développe un complexe coloré (bleu-vert), dont l'absorbance à 660 nm est mesurée. Cette valeur est comparée à une courbe d'étalonnage préparée avec des solutions de Bovine Sérum Albumin (BSA) aux concentrations connues (0–100 µg/mL), permettant de déterminer la concentration protéique de l'échantillon. Cette mesure est essentielle pour exprimer l'activité enzymatique spécifique en unités d'activité par milligramme de protéine (UE/mg protéine), une étape clé pour caractériser la performance des enzymes obtenues par fermentation de bactéries lactiques. **Novak et al. (2022), Abdelhamid, M., et al. (2023).**

II.3.4.5. Optimisation de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique de LAB

L'activité coagulante (AC) d'un extrait enzymatique de bactéries lactiques a été optimisée en examinant quatre paramètres majeurs : la température**,** le pH, la concentration en $CaCl_2$**,** et la concentration en enzyme. Les mesures ont été réalisées dans des conditions standard (substrat Berridge : lait écrémé reconstitué à 35 °C, pH 6,4, et $CaCl_2$ (0,01 M), chaque essai étant répété 3 fois pour garantir la fiabilité des données.

- **Température optimale** : l'intervalle testé s'est étendu de 25 à 55 °C (par palier de 10 °C), avec détermination de la température à laquelle le temps de coagulation est le plus court**,** révélant l'efficacité maximale de l'enzyme.
- **Concentration enzymatique optimale** : différents volumes d'extrait (de 300 µL à 1500 µL dans 10 mL de lait) ont été testés pour identifier la quantité minimale d'enzyme nécessaire à une coagulation efficace.
- **Variation du pH** : le pH initial du lait a été ajusté de 5,0 à 7,0 (par palier de 0.2), contrôlé via ajout de HCl ou NaOH, pour observer le meilleur pH de coagulation.
- **Concentration de $CaCl_2$** : de 0.55 à 2 mM ont été évalués pour identifier la teneur en calcium favorisant la coagulation la plus rapide.

Ces étapes permettent de modéliser précisément l'effet de chaque facteur sur l'activité coagulante, en adéquation avec les approches standardisées.

II.4. Essai de fabrication du fromage par coagulation enzymatique et mixte

II.4.1. Technologie de préparation

L'élaboration du fromage a été réalisée en laboratoire en suivant un procédé expérimental inspiré des pratiques industrielles. Le choix des extraits enzymatiques et des levains lactiques utilisés repose sur les résultats des tests d'activité enzymatique et de fermentation précédemment réalisés.

II.4.1.1. Préparation des levains lactiques

Les levains ont été préparés à partir de lait écrémé à 10 %, soumis à un traitement thermique en deux étapes (tyndallisation) : une première pasteurisation à 72 °C pendant 30 minutes, suivie d'un refroidissement à 50 °C, puis une seconde pasteurisation à 95 °C durant

15 secondes. Après refroidissement à 42 °C, le lait a été ensemencé avec les levains sélectionnés, puis incubé à 37 °C pendant 10 à 12 heures, jusqu'à atteindre un pH compris entre 4,6 et 4,9.

Trois levains différents ont été formulés, en variant les espèces de bactéries lactiques et leurs proportions :

- **Levain 1** : 5 % de *Limosilactobacillus fermentum* BLBM O + 2,5 % de *Lactiplantibacillus plantarum* BLBM S13
- **Levain 2** : 5 % de *Apilactobacillus kunkeei* BLBM D + 3 % de *Apilactobacillus kunkeei* BLBM AB
- **Levain 3** : 5 % de *Apilactobacillus kunkeei* BLBM D + 2,5 % de *Limosilactobacillus fermentum* BLBM O + 1,5 % de *Lactiplantibacillus plantarum* BLBM J.

I.4.1.2.Préparation du fromage

L'objectif principal de ces essais est d'évaluer la capacité coagulante des extraits enzymatiques de LAB, seuls ou combinés avec des levains, dans la fabrication de fromage. Deux types de lait ont été utilisés :

1. Un mélange de lait en poudre écrémé
2. Du lait de vache pasteurisé.

Dans les deux cas, les laits ont été soumis à un traitement thermique, puis inoculés avec les levains et/ou extraits enzymatiques.

II.4.1.2.1. Essais de préparation par coagulation mixte (enzymatique + levains)

Trois essais ont été réalisés selon différentes combinaisons d'extraits enzymatiques et de levains :

- **Essai 1 (Lait de vache)** : 3 % du Levain 1 + 1 mL d'extrait enzymatique de *A. kunkeei* BLBM D et BLBM AB.
- **Essai 2 (Lait de vache en et lait en poudre)** : 3 % du Levain 2 + 1 mL d'extrait de *L. fermentum* BLBM O et *L. plantarum* BLBM S13.
- **Essai 3** : 3 % du Levain 3 + 1 mL d'extrait de *L. fermentum* BLBM O.

II.4.1.2.2. Fabrication par coagulation exclusivement enzymatique

D'autres essais ont été menés en utilisant uniquement des extraits enzymatiques pour évaluer leur potentiel coagulant sans apport de levains :

- **Essai 4** : 1 mL d'extrait de *L. fermentum* BLBM O + 1 mL de *L. plantarum* BLBM S13.
- **Essai 5** : 1 mL d'extrait de *A. kunkeei* BLBM D + 1 mL de *A. kunkeei* BLBM AB.
- **Essai 6**: 1 mL d'extrait de *A. kunkeei* BLBM D uniquement.
- **Essai 7** : 1 mL d'extrait de *L. fermentum* BLBM O uniquement.

La préparation a été réalisée en laboratoire selon un procédé à échelle industrielle. Les quantités des ingrédients utilisés sont indiquées dans le tableau (03) et le schéma des figures (09 et 10) illustre les principales étapes suivies durant le processus de préparation.

Tableau 03 : La quantité des ingrédients intervenant dans la préparation.

	Quantité des Ingrédients
Recette de la préparation	PDL 0% : 48 g/l PDL 26% :77g/l Sel : 1.5g/ 100 g Levains lactiques 3 %. Eau 875ml

Source : Dr. BOUCHIBANE Malika (MCB à l'université de Médéa).

Dr Dahou Abdelkaderelamine (MCA à l'université de Mostaganem).

Protocole 1

1-Pasteurisation 78 à 80°C

2-refroidissement

3-Ajout de 0.5g de calcium

4-Ensemencement (Inoculation 3% des levains lactiques selon chaque essai).

5-maturation 30min

6-Emprésurage par 1ml /L du l'extrait protéase et coagulation pendant 40 à 50 min.

7-Découpage en 2cm.

8-Brassage 32-35°C.

9- Moulage et pressage (Egouttage en moules avec 03 retournement chaque ½ heure).

10- Salage.

11- Affinage à 14-15°C à HR 85-90% et pendant 10 jours.

Figure 09 : Les étapes suivies durant le processus de préparation par coagulation mixte (Essais 1,2 et 3).

Protocole 2

1-Pasteurisation à 78 à 80°C.

2-refroidissement 37 à 39 o C.

3-Ajout de 0.5g de calcium.

4-Emprésurage (1 ml d'extrait de protéase lactique).

5-maturation 45min.

6-Découpage.

7-Brassage 32-35 o C

8- Moulage et pressage (Egouttage en moules avec 03 retournement chaque ½ heure)

9- Salage

10- Affinage à 14-15°C à HR 85-90% et pendant 10 jours.

Figure 10 : Les étapes suivies durant le processus de préparation par coagulation enzymatique (Essais4, 5,6 et 7).

II.5.Analyses physico-chimique et microbiologiques du produit fini (Fromage).

II.5.1Analyses physico-chimique

L'évaluation physico-chimique du fromage fini repose sur l'analyse de cinq paramètres clés : le pH, l'acidité titrable, la teneur en matière grasse (MG), l'extrait sec total (EST) et l'extrait sec dégraissé (ESD). ces paramètres ont été déterminés en suivant les protocoles de l'usine SIDI SAADA selon les normes internationales **(ISO 5534:2014, ISO 11870:2009, AFNOR V04-206:1969)** ainsi qu'aux normes algériennes correspondantes **(NA 679, NA 1130, NA 15019, NA 678).**

II.5.1.1. Mesure du pH

Le pH influence directement la texture, la fermentation et la conservation du fromage **(Demiral et al., 2024).** Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre après insertion directe de l'électrode dans un mélange homogène de 10 g de fromage et 10 mL d'eau distillée. La valeur finale est déterminée par la moyenne de trois lectures successives, assurant ainsi la fiabilité des résultats.

II.5.1.2. Détermination de l'acidité titrable

L'acidité a été déterminée en ajoutant 4 à 5 gouttes de phénolphtaléine (1 % dans l'éthanol) à un mélange de 10 mL d'eau distillée et 10 g de fromage, puis en titrant avec une solution de NaOH 0,1 N jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle. Le volume de soude consommé est exprimé en degrés Dornic (°D), selon la formule :

$$\textbf{Acidité (°D)} = V \times 10$$

où V est le volume de NaOH utilisé (en mL).

II.5.1.3. Détermination de l'extrait sec total (EST)

La teneur en extrait sec a été évaluée soit par étuvage (à 102 ± 2 °C pendant 3 heures dans une capsule de verre). Le calcul du pourcentage de matière sèche est effectué via la formule suivante **(AFNOR, 1985)**

$$\textbf{MS \%} = (M_1 - M_0) / (M_2 - M_0) \times 100$$

où :

- M_0 = masse de la capsule vide,
- M_2 = masse de la capsule avec le fromage avant séchage,
- M_1 = masse après dessiccation.

II.5.1.4. Détermination de la teneur en matière grasse (MG)

La teneur en matière grasse du fromage a été déterminée par la méthode acido-butyrométrique, fondée sur la dissociation des protéines par l'acide sulfurique, suivie de l'extraction des lipides à l'aide d'alcool isoamylique. Après centrifugation, la matière grasse est lue directement sur un butyromètre gradué.

Pour cela, 3 g de fromage râpé sont introduits dans un butyromètre, auxquels sont ajoutés successivement 10 mL d'acide sulfurique concentré puis 1 mL d'alcool isoamylique. Après une agitation douce, le tout est centrifugé (1200–1500 tr/min, 5 min) puis placé dans un bain-marie à 65–70 °C pour fluidifier la graisse. La lecture finale s'effectue selon la formule :

$$\mathbf{MG\ (\%) = B - A},$$

où **B** est la lecture supérieure et **A** la lecture inférieure de la colonne lipidique.

II.5.1.5. Extrait sec dégraissé (ESD)

Le calcul de l'extrait sec dégraissé se fait par soustraction directe de la matière grasse de l'extrait sec total, comme suit :

$$\mathbf{ESD\ (\%) = EST - MG}$$

II.5.2. Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques du produit fini ont été évaluées par la recherche et le dénombrement de micro-organismes indicateurs de contamination et d'altération, susceptibles d'affecter la sécurité sanitaire et les qualités organoleptiques du fromage. L'ensemble des analyses a été réalisé selon les normes **NA 15174** et **ISO 6887-4 (2017)**.

II.5.2.1. Préparation des dilutions

Pour chaque échantillon analysé, une dilution décimale a été préparée en pesant 25 g de fromage dans un flacon stérile contenant 225 mL de diluant (TSE : tryptone-sel-eau). Cette

suspension initiale constitue la dilution mère (10^{-1}). À partir de celle-ci, 1 mL a été transféré dans 9 mL de diluant stérile pour obtenir successivement les dilutions 10^{-2} et 10^{-3}, selon la méthode de dilution en série classique.

II.5.2.2. Recherche et dénombrement des germes de contamination

Les dilutions préparées (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) ont été ensemencées en masse dans des milieux spécifiques, selon les germes ciblés. Les résultats du dénombrement sont exprimés en unités formant colonie par gramme (UFC/g), selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum c}{n_1 \times d}$$

Où :

∑c : somme des colonies comptées sur les boîtes sélectionnées,

d : facteur de dilution de la première boîte retenue.

II.5.2.2.1 Coliformes totaux (CT) et coliformes fécaux (CF)

Les coliformes ont été recherchés sur gélose VRBL. L'incubation a été effectuée à 37 °C pendant 24–48 heures pour les coliformes totaux, et à 44 °C pour les coliformes fécaux. Seules les boîtes présentant entre 15 et 150 colonies ont été considérées pour le dénombrement.

II.5.2.2.2 Levures et moisissures

Le dénombrement des levures et moisissures a été réalisés sur gélose Sabouraud par ensemencement en masse de 1 mL de dilution. Les boîtes ont été incubées à 25 °C pendant 5 jours. Cette méthode permet d'évaluer la charge fongique, indicatrice de contamination post-fabrication ou d'altération du produit lors du stockage.

Chapitre III: Résultats et Discussion

III.1. Résultats de la validation de la pureté des souches lactiques

Après la revivification des souches lactiques sur bouillon MRS, un trouble visible est apparu au bout de 24 heures d'incubation à 30 °C, témoignant d'une croissance bactérienne satisfaisante (figure 11). L'étape suivante, consacrée à la purification sur gélose MRS, a permis d'obtenir des colonies bien distinctes, de forme circulaire, bombée, et de couleur blanchâtre (figure 11). Pour vérifier la pureté des isolats, deux tests préliminaires ont été réalisés : la coloration de Gram et le test de catalase. Toutes les souches se sont révélées Gram positif (coloration violette) et catalase négatif, ce qui est caractéristique des bactéries lactiques. L'examen microscopique a montré des morphologies en bâtonnets, soit isolés, soit en chaînes (figure 12). Ces observations concordent avec celles rapportées par **Bouchibane et al. (2023),** qui ont décrit des profils macroscopiques et microscopiques similaires pour des souches lactiques isolées à partir de matrices laitières.



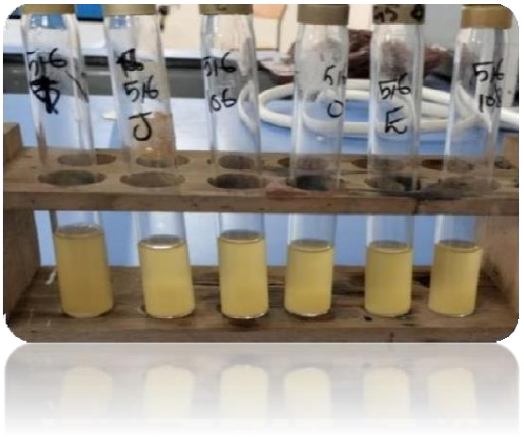


Figure11: Aspect macroscopique des souches lactiques purifiées sur gélose et en bouillon

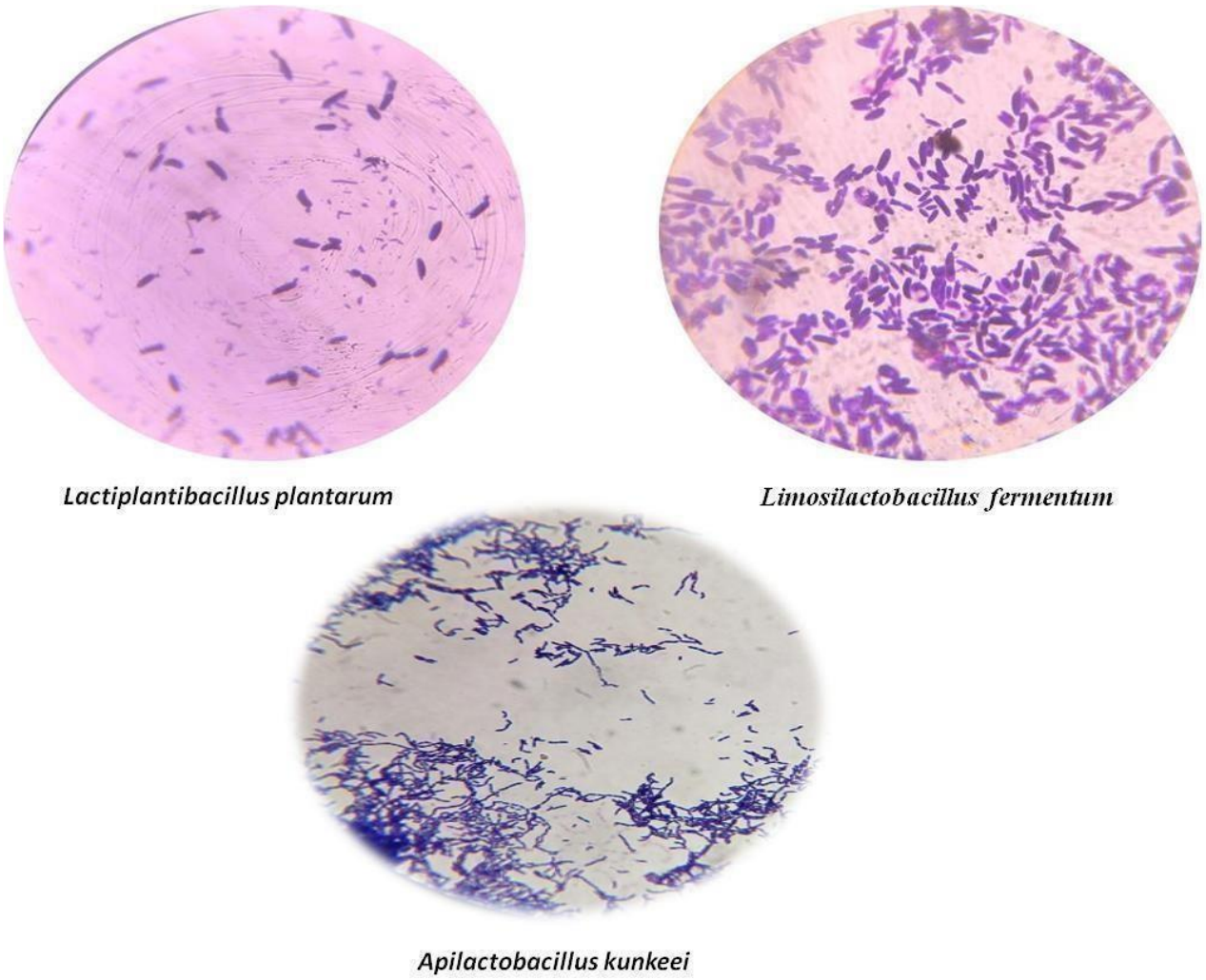


Figure12: Morphologie cellulaire des souches lactiques révélée par la coloration de Gram

III.2. Résultats de l'activité Protéolytique des souches lactiques testées

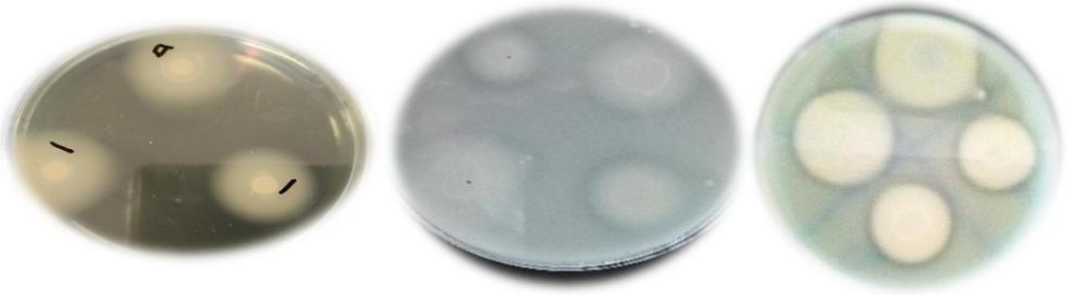
Les résultats relatifs à l'activité protéolytique des souches lactiques sont présentés dans la Figure 13. Toutes les souches analysées ont montré une capacité à hydrolyser les protéines, comme en témoignent l'apparition de zones sombres et claires sur les milieux de culture utilisés (PCA et MRS supplémentés en lait écrémé).

Par ailleurs, une dégradation marquée des caséines ajoutées au bouillon MRS a été observée chez l'ensemble des souches. Sur gélose, la présence de zones de transparence ou d'opacité autour des sites d'ensemencement constitue une preuve visuelle de protéolyse locale. Ce comportement est en accord avec les observations de **Donkor et al. (2007)** ainsi que

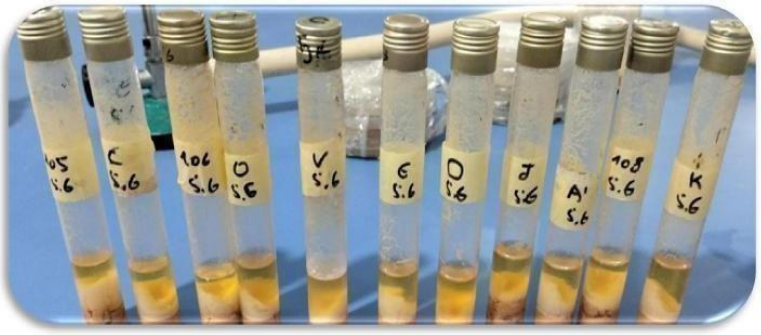
d'ounouala et al. (2017) , qui rapportent une activité protéolytique fréquente chez les souches lactiques issues de produits fermentés traditionnels.

En milieu liquide, la formation d'un coagulum homogène après incubation à 37 °C confirme cette aptitude enzymatique. Ces résultats rejoignent ceux de **Bouchibane (2022),** qui a démontré que le bouillon MRS dépourvu de peptone peut constituer un test discriminant pour détecter l'hydrolyse enzymatique de la caséine.

Ainsi, la forte activité protéolytique des souches testées représente un critère favorable à leur utilisation en fromagerie, notamment dans la production de fromages affinés, où la libération de peptides et d'acides aminés joue un rôle clé dans le développement des qualités organoleptiques. Toutefois, une activité trop intense peut induire une amertume indésirable dans le produit final. Il est donc essentiel de coupler cette analyse à l'évaluation de l'activité coagulante (AC), afin de déterminer le ratio AC/AP et d'identifier les souches offrant le meilleur équilibre technologique.



MRS et PCA + 10% du lait écrème



MRS+ 10% de la caséine du lait

Figure 13: Mise en évidence de l'activité protéolytique des souches sur différents milieux de culture.

III.3. Résultats d'évaluation de l'activité coagulante des extraits enzymatiques de bactéries lactiques

L'analyse de l'activité coagulante des extraits enzymatiques issus des souches de bactéries lactiques étudiées révèle une hétérogénéité prononcée, tant entre différentes espèces qu'entre souches appartenant au même espèces . Cette activité, mesurée en unités Soxhlet (F(US)) et en unités présure (UP), met en évidence des contrastes notables. Parmi l'ensemble des souches évaluées, ***Apilactobacillus kunkeei*** se distingue nettement : les souches BLBM D et AB affichent respectivement des F(US) de 120,00 et 114,28, correspondant à des valeurs converties de 185,11 et 105,77 US selon la formule F(US)=UP/0,0045. Ces niveaux d'activité dépassent ceux observés chez les autres souches lactiques et atteignent des performances comparables à celles de coagulases modérées telles que *Bacillus subtilis* natto (182 US, **Shieh et al., 2009).**

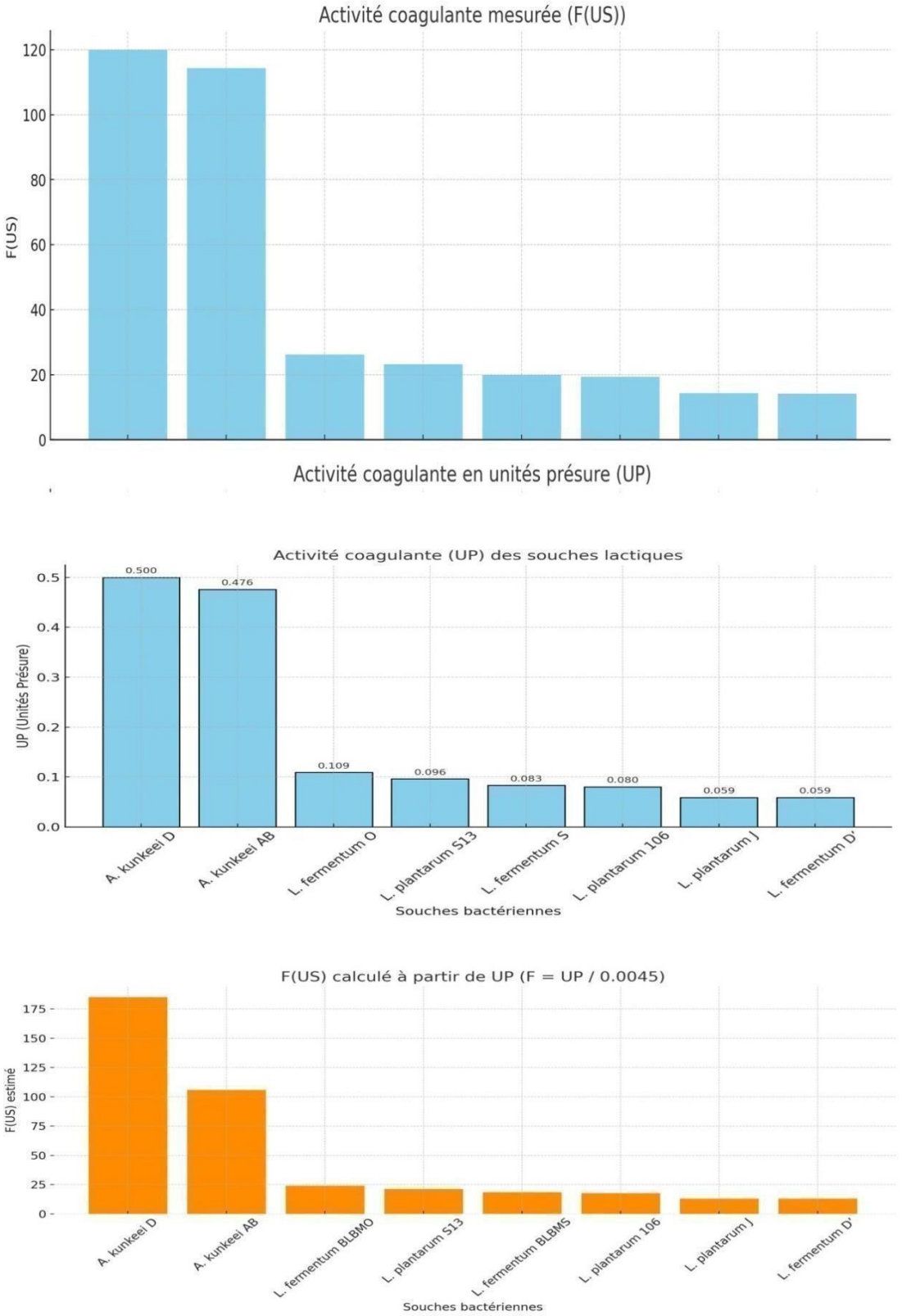


Figure 14: Activité coagulante mesurée (F(US)) des extraits enzymatiques de souches de bactéries lactiques.

L'activité coagulante remarquable observée chez certaines souches, en particulier ***A. kunkeei***, peut être attribuée à des propriétés enzymatiques spécifiques, notamment la production d'enzymes hydrolytiques telles que la β-galactosidase et la β-glucosidase, associée à une activité protéolytique potentiellement élevée (**Vergalito et al., 2020).** Sa capacité à tolérer des conditions de stress osmotique renforcerait la stabilité de cette expression enzymatique, même en milieu lacté riche (Iorizzo et al., 2020). Parmi les bactéries lactiques étudiées, les souches *L. fermentum BLBM O* et *L. plantarum BLBM S13* se démarquent par leurs performances élevées en termes de facteur unitaire de solidification F(US) et d'unité de pouvoir coagulant (UP), avec des valeurs respectives de F(US) de 26,17 et 23,23, soit 24,22 et 21,33 après conversion à partir des UP (0,109 et 0,096). Ces performances confirment une activité coagulante significative, contrairement aux autres souches de *Lactiplantibacillus plantarum* et *Limosilactobacillus fermentum*, dont les F(US) se situent entre 14,16 et 19,98, traduisant une efficacité plus modérée. Ces résultats corroborent ceux **d'Adesokan et al. (2024),** qui ont rapporté une coagulation lente chez *L. plantarum*, probablement due à une hydrolyse partielle de la κ-caséine, ainsi que ceux de **Kumari Narwal et al. (2016),** soulignant une variabilité enzymatique selon les souches et les conditions de culture. En comparaison avec des coagulases microbiennes plus puissantes, telles que celles produites par *Bacillus amyloliquefaciens* D4 (4645,16 US ; He et al., 2011) ou *B. mojavensis* P47M (5400 US ; **Nouani & Kahlouche, 2017),** les LAB restent globalement moins efficaces, ce qui reflète un mécanisme de coagulation plus lent et moins spécifique. Néanmoins, leur potentiel reste notable pour des applications dans des produits laitiers à fermentation douce. Par ailleurs, la faible différence entre les valeurs expérimentales de F(US) et celles calculées via UP/0,0045 confirme la robustesse et la cohérence des données obtenues. À ce jour, aucune étude n'a rapporté des valeurs de F(US) aussi élevées pour des souches lactiques isolées localement, ce qui confère à ces résultats un caractère novateur et prometteur pour le développement de coagulants microbiens d'origine locale en technologie laitière.

III.4. Évaluation de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques et du rapport AC/AP

Les bactéries lactiques sont largement étudiées pour leurs propriétés techno fonctionnelles en transformation laitière. En plus de leur capacité à acidifier le lait, certaines souches présentent des activités enzymatiques spécifiques, notamment coagulante **(**AC) et protéolytique (AP), pouvant jouer un rôle dans la fabrication de fromages sans présure d'origine animale.

Tableau 04: Évaluation de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques des souches lactiques et rapport AC/AP

Souche bactérienne testées	F (US) mesuré	Abs. 660nm (AP)	Ratio AC/AP (US/DO)
***A. kunkeei* BLBM D**	120.00	1.052	114.05
***A. kunkeei* BLBM AB**	114.28	1.034	110.52
***L. fermentum* BLBM O**	26.17	0.400	65.43
***L. plantarum* BLBM S13**	23.23	0.441	52.67
***L. fermentum* BLBM S**	19.98	0.598	33.41
***L. plantarum* BLBM 106**	19.40	0.492	39.43
***L. plantarum* BLBM J**	14.33	0.320	44.78
***L. fermentum* BLBM D'**	14.16	0.356	39.78

Les résultats mettent en évidence une variabilité significative de l'activité enzymatique parmi les souches lactiques testées. Les souches d'*Apilactobacillus kunkeei* (BLBM D et AB) se distinguent par leurs très fortes activités coagulantes (F = 120,00 et 114,28 US) mais aussi par une activité protéolytique élevée (Abs 660 nm >1), ce qui se traduit par des rapports AC/AP supérieurs à 110. Ces caractéristiques indiquent un pouvoir coagulant puissant mais associé à une protéolyse excessive, susceptible d'altérer la texture et de générer de l'amertume dans les produits laitiers fermentés, comme le signalent **García et al. (2023)** et **Yilmaz-Ersan et al. (2022)**. En revanche, des souches comme *L. fermentum* BLBMO et *L. plantarum* S13 présentent un meilleur équilibre, combinant une bonne activité coagulante avec une activité protéolytique modérée, conférant des ratios AC/AP favorables (65,43 et 52,67). Cette synergie est recherchée en technologie fromagère, car elle permet une coagulation efficace sans excès d'hydrolyse des caséines, préservant ainsi la texture du caillé **(Silva et al., 2021).**

Ces deux souches pourraient ainsi constituer de bons candidats pour le développement de coagulants microbiens alternatifs à la présure animale, notamment dans des produits laitiers artisanaux. Par ailleurs, les faibles ratios AC/AP enregistrés chez les autres souches de *L. fermentum* et *L. plantarum* (< 45) traduisent une efficacité plus limitée. Ces résultats sont cohérents avec ceux d'études antérieures, telles que celles de **Arenas et al. (2016)** et **Adesokan et al. (2024)**, qui soulignent l'importance du rapport entre coagulation et protéolyse dans la sélection des souches fromagères. En conclusion, bien que les souches d'*A. kunkeei* affichent une activité enzymatique remarquable, leur application nécessite des ajustements, tels que la purification des extraits ou la modulation de l'expression protéolytique, afin de limiter les effets indésirables sur le produit fini.

III.5. Résultats Dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique

La quantification des protéines totales présentes dans les extraits enzymatiques bruts (EEB) a été réalisée selon la méthode colorimétrique de **Lowry et al. (1951),** largement reconnue pour sa sensibilité dans la détection des protéines dans des matrices biologiques complexes, notamment les extraits microbiens. Cette méthode repose sur la formation d'un complexe coloré mesurable spectrophotométriquement, en présence du réactif de Folin-Ciocalteu. La concentration protéique a été estimée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard de référence (voir Annexe 03).

Tableau 05: Teneur en protéines totales des extraits enzymatiques bruts lactiques (EEB) de différentes souches bactériennes lactiques

Souche bactérienne	Teneur en protéines (µg/mL)
A. kunkeei BLBM D	210.60
A. kunkeei BLBM AB	206.88
L. fermentum BLBM S	119.80
L. plantarum BLBM 106	98.60
L. plantarum BLBM S13	88.40
L. fermentum BLBM O	80.20
L. fermentum BLBM D'	71.40
L. plantarum BLBM J	64.20

Les résultats montrent une importante variabilité dans la teneur en protéines des extraits enzymatiques bruts (EEB) selon les souches bactériennes étudiées. Les souches *Apilactobacillus kunkeei* (BLBM D et AB) présentent les concentrations les plus élevées, dépassant 200 µg/mL, ce qui reflète leur forte capacité de biosynthèse protéique. Cette performance peut être liée à une expression enzymatique accrue, souvent rapportée chez cette espèce dans des matrices riches en sucres, comme le miel (**Abdelhamid et al., 2023)**. En comparaison, les souches de *Lactiplantibacillus plantarum* et *Limosilactobacillus fermentum* affichent des teneurs plus faibles, comprises entre 64,20 et 119,80 µg/mL, traduisant une variabilité inter-souches marquée en termes de production enzymatique. Des résultats similaires ont été observés par **Novak et al. (2022),** qui ont rapporté des teneurs en protéines variant entre 90 et 180 µg/mL pour des extraits de *L. plantarum* et *L. casei*, en fonction des conditions de culture (type de substrat, pH, durée d'incubation). Ces données sont en accord avec les valeurs obtenues pour les souches *L. plantarum* BLBM 106 et S13 dans cette étude. De même, **Ben Zineb et al. (2023),** travaillant sur des isolats lactiques issus de fromages traditionnels algériens, ont rapporté des concentrations protéiques moyennes situées entre 85 et 140 µg/mL, ce qui corrobore les valeurs obtenues ici pour les souches *L. fermentum*. Il est toutefois important de souligner que des travaux comme ceux de **Kumari Narwal et al. (2016)** ont rapporté des concentrations plus élevées, jusqu'à 300 µg/mL, notamment pour des extraits obtenus à partir de millets fermentés – un écart probablement attribuable aux différences de sources carbonées et aux conditions de fermentation optimisées. En somme, les souches d'*A. kunkeei* semblent se démarquer par leur potentiel de production protéique élevé, ce qui pourrait constituer un avantage en tant que source d'enzymes coagulantes, sous réserve de maîtriser l'activité protéolytique excessive associée.

III.6. Résultats d'Optimisation de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique de LAB

III.6.1. Résultats de l'effet de la température sur l'activité coagulante

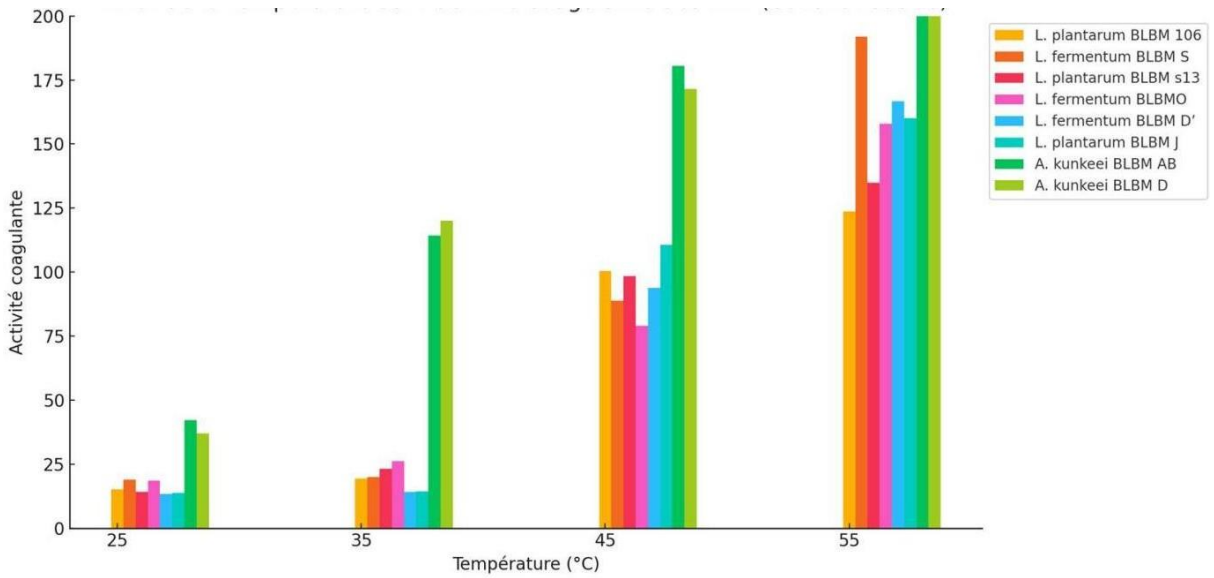


Figure 15: Effet de la température sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique des LAB

L'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés montre une augmentation significative avec la température, atteignant son maximum à 55 °C pour toutes les souches, notamment pour *Apilactobacillus kunkeei* AB et D, avec des valeurs atteignant respectivement 320,00 **et** 266,67 US**,** traduisant une remarquable thermo stabilité enzymatique. Cette tendance, marquée dès 35 °C, indique une activation progressive des protéases produites par les bactéries lactiques jusqu'à leur température optimale.

À 25 °C, toutes les souches présentent une activité relativement faible, ce qui est typique d'une activité enzymatique limitée à basse température. Cependant, les souches d'*A. kunkeei* conservent une activité modérée (42,11–36,92 US)**,** suggérant une capacité enzymatique basale même à température ambiante. Dès 35 °C**,** une augmentation notable de l'AC est observée, notamment chez *A. kunkeei*, qui dépasse déjà les 100 unités**, c**e qui démontre une forte sensibilité thermique et une pré-activation enzymatique efficace.

L'optimum est atteint entre 45 et 55 °C**,** période durant laquelle toutes les souches atteignent ou approchent leur performance maximale. Les souches *L. plantarum* (106 et S13) et *L. fermentum* (S et D') montrent également de bonnes performances à haute température (100–192 US), ce qui est caractéristique des protéases thermostables d'origine bactérienne**.** Ces observations sont cohérentes avec les travaux de **Liu et al. (2020)**, qui ont montré que les protéases de *L. plantarum* conservent plus de 70 % de leur activité entre 45 °C et 55 °C. De même, **Ben Zineb et al. (2023)** ont rapporté une activité maximale proche de 178,5 US à

50 °C pour une enzyme extraite de *Bacillus mojavensis*, proche des valeurs relevées ici pour *L. fermentum* et *L. plantarum*.Les souches d'*A. kunkeei* se démarquent par leur activité coagulante exceptionnelle à la fois à basse et haute température, traduisant une large plage de stabilité thermique**.** Cette capacité est particulièrement avantageuse pour des procédés fromagers thermophiles ou des matrices nécessitant un traitement à haute température. Selon **Karakas-Sen & Karakas (2018)**, les enzymes produites par les LAB montrent généralement un optimum thermique situé entre 40 et 50 °C, ce qui correspond bien à la majorité des profils observés. Enfin, la forte activité enzymatique maintenue à 55 °C, en particulier chez *L. fermentum* S et *A. kunkeei*, ce qui renforce leur potentiel en tant qu'agents coagulants alternatifs dans les technologies laitières modernes, où des températures élevées sont souvent utilisées pour la pasteurisation ou le caillage.

III.6.2. Résultats de l'effet du pH sur l'activité coagulante

L'activité coagulante des extraits enzymatiques bruts (EEB) dépend fortement du pH, avec des performances maximales observées dans une plage étroite comprise entre pH 6.2 et 6.4**.** Cette tendance indique que les protéases produites par les souches lactiques testées sont actives en milieu légèrement acide, ce qui est compatible avec les conditions naturelles du lait et des procédés fromagers. **(tableau 06).**

Tableau 06 : Effet du pH sur l'activité coagulante

pH	*L. plantarum BLBM 106*	*L. fermentum BLBM S*	*L. plantarum BLBM s13*	*L. fermentum BLBMO*	*L. fermentum BLBM D'*	*L. plantarum BLBM J*	*A. kunkeei BLBM AB*	*A. kunkeei BLBM D*
6.0	—	20.27	25.48	26.73	—	—	—	—
6.1	—	—	—	—	28.07	—	—	—
6.2	—	18.42	—	—	—	26.09	—	200.00
6.3	16.22	—	—	—	—	—	160.00	150.00
6.4	—	—	23.67	24.00	24.24	24.92	—	—
6.6	15.43	—	—	—	—	—	109.09	101.69
6.8	—	—	—	—	—	22.43	—	—
6.9	—	—	—	21.76	22.18	—	—	—
7.0	—	—	21.16	—	—	—	80.54	—
7.1	—	13.14	—	—	—	—	—	—
7.5	7.74	—	—	—	—	—	—	—

Parmi les résultats les plus remarquables, les souches *Apilactobacillus kunkeei* BLBM D et AB ont affiché des valeurs d'activité coagulante extrêmement élevées, respectivement 200,00 à pH 6.2 **et** 160,00 à pH 6.3**,** suivies d'une diminution progressive jusqu'à 101,69 à pH 6.6 pour la souche D. Cette chute d'activité au-delà de pH 6.4 traduit une perte d'affinité

enzymatique pour le substrat, probablement liée à une altération de la conformation du site actif, comme le suggèrent **Karakas-Sen & Karakas (2018)**. De façon similaire, *L. plantarum* S13 et *L. fermentum* BLBMO présentent des pics d'activité notables à pH 6.0–6.4 (25.48 et 26.73 U, respectivement), ce qui reflète une forte affinité enzymatique dans des conditions faiblement acides. Les souches *L. fermentum* S et *L. plantarum* J maintiennent également une activité modérée dans cette plage (entre 18 et 26 U), mais présentent une sensibilité plus marquée aux variations de pH**,** avec une disparition quasi-totale de l'activité au-delà de pH 7.0. Cette tendance a également été rapportée par **Bravo Bolívar et al. (2023)**, qui ont montré une perte drastique d'activité coagulante chez *Lactobacillus* au-dessus de pH 6.8. De leur côté, **Díaz-Orozco et al. (2024)** ont décrit un optimum d'AC à pH 6.3 pour *L. plantarum*, suivi d'une diminution rapide dès pH 6.8, ce qui est cohérent avec les observations faites pour les souches BLBM S13 et J. En résumé, les souches d'*A. kunkeei* montrent une excellente tolérance et efficacité enzymatique dans une plage légèrement acide**,** renforçant leur potentiel comme sources alternatives de coagulants microbiens, tandis que les souches de *L. plantarum* et *L. fermentum* confirment une activité optimale plus étroite, ce qui pourrait limiter leur usage à des environnements bien contrôlés en pH.(**tableau 06).**

III.6.3. Résultats du l' Effet du volume d'extrait enzymatique sur l'activité coagulante

Les résultats concernant l'impact du volume de l'extrait enzymatique sur son activité coagulante sont présentés dans le tableau (07) ci-dessous.

Tableau 07: Activité coagulante (AC) selon le volume d'extrait enzymatique (µL / 10 mL)

Volume extrait(µL / 10 mL)	***L. plantarum BLBM 106***	***L. plantarum BLBMs13***	***L. fermentum BLBM S***	***L. fermentum BLBM D'***	***L. fermentum BLBMO***	***A. kunkeei BLBM AB***	***A. kunkeei BLBM D***	***L. plantarum BLBM J***
300 µL	15.89	8.75	15.79	8.20	20.02	82.76	96.00	8.83
500 µL	16.55	18.79	16.26	13.81	23.69	104.35	109.09	14.24
1000 µL	19.40	23.23	19.98	14.17	26.17	114.29	120.00	14.34
1500 µL	35.35	42.86	34.68	33.33	59.41	150.00	162.16	25.08

L'augmentation progressive du volume d'extrait enzymatique de 300 à 1500 µL par 10 mL de lait entraîne une hausse significative de l'activité coagulante (AC) pour l'ensemble des souches étudiées, avec une réponse clairement dose-dépendante. Les souches d'*Apilactobacillus kunkeei* (BLBM AB et D) se distinguent nettement, présentant les valeurs d'AC les plus élevées, avec une efficacité enzymatique doublée voire triplée entre les volumes extrêmes testés, sans qu'aucun signe de saturation ne soit observé. Cette absence de

plateau enzymatique suggère que, dans les conditions expérimentales, les concentrations appliquées restent inférieures à la capacité maximale de coagulation et que le système enzymatique demeure efficace même à forte dose. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par **Ben Zineb et al. (2023)**, qui ont montré une augmentation linéaire de l'AC avec la dose d'enzyme chez *Bacillus mojavensis*, avec un plateau seulement observé au-delà de 3000 µL/10 mL. De même, **Alam et al. (2025)** ont observé chez *Lactiplantibacillus plantarum* une activité maximale atteinte autour de 2000 µL/10 mL, confirmant que des volumes plus élevés peuvent continuer à améliorer la performance jusqu'à un certain seuil. Par ailleurs, **Kouadri Boudjelthia et al. (2023)** ont mis en évidence une activité accrue de *Limosilactobacillus fermentum* jusqu'à 1500 µL, bien que leur rendement spécifique soit inférieur à celui observé chez *A. kunkeei*, ce qui renforce l'avantage comparatif de cette dernière dans une optique d'exploitation industrielle. Globalement, ces données indiquent que toutes les souches réagissent positivement à l'augmentation du volume d'extrait, et que des essais complémentaires à des doses supérieures pourraient être envisagés pour déterminer le point de saturation enzymatique. La forte activité des extraits *d'A. kunkeei*, combinée à leur stabilité à haute dose, positionne ces souches comme des candidates prometteuses pour la formulation de coagulants microbiens hautement efficaces, notamment dans les procédés fromagers à grande échelle.

III.6.4. Résultats du l'effet de la concentration en chlorure de calcium ($CaCl_2$) sur l'activité coagulante

Tableau 08: Effet de la concentration en chlorure de calcium ($CaCl_2$) sur l'activité coagulante (AC) des extraits enzymatiques de différentes souches de bactéries lactiques

Concentration (%)	*L. plantarum 106*	*L. plantarum s13*	*L. fermentum S*	*L. fermentum D'*	*L. fermentum BLBMO*	*A. kunkeei AB*	*A. kunkeei D*	*L. plantarum BLBM J*
0.055	13.19	15.11	14.55	12.79	17.52	92.31	98.36	12.12
0.11	19.40	23.23	19.98	14.17	26.17	114.29	120.00	14.34
0.20	25.26	28.24	24.00	18.75	33.33	133.33	142.86	21.24

L'augmentation progressive de la concentration en chlorure de calcium ($CaCl_2$) de 0,055 % à 0,20 % a entraîné une hausse significative de l'activité coagulante (AC) chez toutes les souches étudiées, confirmant le rôle fondamental du calcium comme cofacteur dans le processus de coagulation. Le Ca^{2+} intervient à deux niveaux : il renforce l'interaction enzyme-substrat (caséines) et facilite la déstabilisation des micelles, condition indispensable à

l'agrégation des caséines après hydrolyse. À la concentration la plus faible (0,055 %), seules les souches *Apilactobacillus kunkeei* (AB et D) ont montré des niveaux d'AC remarquables (92,31 et 98,36 U), ce qui suggère une forte affinité enzymatique même en condition limitante en ions calcium. À mesure que la concentration de $CaCl_2$ augmente, une amélioration progressive de l'AC est observée, notamment à 0,11 %, chez *L. fermentum* BLBMO (26,17 U) et *L. plantarum* S13 (23,23 U), traduisant une sensibilité des enzymes de ces souches à l'enrichissement calcique. À 0,20 %, toutes les souches atteignent leur maximum d'activité, avec des valeurs culminant à 142,86 U (*A. kunkeei* D) et 133,33 U (*A. kunkeei* AB), ce qui confirme leur potentiel industriel élevé en tant que coagulants microbiens**.** Ce profil dose-dépendant est cohérent avec les résultats de **Ben Zineb et al. (2023)**, qui ont démontré que l'addition de $CaCl_2$ jusqu'à 0,2 % stimule fortement l'AC des enzymes de *Lactobacillus*, en optimisant la précipitation des caséines. De même, **Karakas-Sen & Karakas (2018)** ont observé une AC maximale à cette concentration lors de l'optimisation de la coagulation avec *L. delbrueckii*, avec un plateau au-delà suggérant une limite physiologique. En complément, **Bouchibane et al. (2022)** ont souligné que les enzymes lactiques ne sont pleinement actives que dans des conditions de disponibilité suffisante en calcium, élément indispensable à la phase post-hydrolyse de la caséine. Ces tendances sont également confirmées par **Bravo Bolívar et al. (2023)**, qui ont rapporté que l'ajout de $CaCl_2$ améliore la gélification du lait fermenté par *Lactobacillus plantarum* jusqu'à un seuil optimal. Enfin, l'absence de saturation apparente à 0,20 % dans nos résultats suggère que des concentrations légèrement supérieures pourraient être testées dans de futurs travaux, bien qu'un excès en Ca^{2+} puisse entraîner une précipitation non spécifique ou une inhibition enzymatique, comme rapporté par **Alvarez et al. (2021)**. Globalement, les résultats mettent en évidence que les extraits d'*A. kunkeei* possèdent une excellente efficacité coagulante c, positionnant ces souches comme de candidates biotechnologiques prometteuses pour remplacer partiellement ou totalement la présure animale dans les procédés fromagers.

Tableau 09: Résumé des effets des paramètres physico-chimiques sur l'activité coagulante (AC) des extraits enzymatiques de LAB

Paramètre étudié	Niveaux testés	Activité coagulante observée (AC)	Condition optimale identifiée
Température (°C)	25 – 35 – 45 –	Faible à 25 °C, hausse marquée à	55 °C (*A.*

	55	partir de 35 °C, pic d'activité entre 45–55 °C, surtout pour *A. kunkeei*	*kunkeei AB* : 320 US)
pH	6.0 – 6.2 – 6.3 – 6.4 – 6.6 – 6.8 – 7.0 – 7.5	AC maximale entre pH 6.2–6.4 (ex. : *A. kunkeei D* à 200 US à pH 6.2), chute rapide au-delà de 6.6	pH 6.2–6.4
Concentration $CaCl_2$ (%)	0.055 – 0.11 – 0.20	Augmentation dose-dépendante, sans saturation apparente. Max à 0.20 % (ex. : *A. kunkeei D* : 142.86 US)	0.20 % $CaCl_2$
Volume extrait (µL/10 mL lait)	300 – 600 – 900 – 1200 – 1500	Réponse dose-dépendante pour toutes les souches ; pas de plateau observé. Max à 1500 µL	1500 µL (*A. kunkeei AB* : > 300 US)

L'optimisation des paramètres physico-chimiques a permis de caractériser les conditions favorables à l'expression maximale de l'activité coagulante (AC) des extraits enzymatiques de LAB, notamment ceux issus de *Apilactobacillus kunkeei, Lactiplantibacillus plantarum* et *Limosilactobacillus fermentum*. Il ressort de cette étude que la température**,** le pH**,** la teneur en chlorure de calcium et le volume d'extrait utilisé exercent une influence significative et souvent synergique sur l'AC.L**'**effet de la température montre une progression nette de l'AC entre 25 °C et 55 °C, avec une stabilité thermique remarquable observée à 55 °C, particulièrement chez *A. kunkeei AB* et *D* (jusqu'à 320 US). Ces résultats sont cohérents avec les données rapportées par **Liu et al. (2020)** et **Ben Zineb et al. (2023)** sur des protéases thermostables issues de souches bactériennes. Concernant le pH, une activité optimale a été enregistrée dans une plage étroite faiblement acide (pH 6.2–6.4)**,** suivie d'une baisse marquée au-delà de pH 6.6, ce qui reflète la nature acide des protéases bactériennes testées. Ce comportement est typique des enzymes impliquées dans la coagulation laitière, comme le confirment les observations de **Bravo Bolívar et al. (2023)** et **Díaz-Orozco et al. (2024)**.

La concentration en chlorure de calcium ($CaCl_2$) s'est avérée être un facteur amplificateur de l'AC, avec un effet dose-dépendant sans saturation apparente jusqu'à 0,20 %, confirmant le rôle clé du Ca^{2+} dans la déstabilisation des micelles de caséines et l'activation des enzymes coagulantes. Ces résultats sont conformes à ceux de **Karakas-Sen & Karakas (2018)** et **Bouchibane et al. (2022)**, qui soulignent l'importance d'un apport calcique contrôlé pour

maximiser l'action enzymatique.Enfin, l'**a**ugmentation du volume d'extrait enzymatique a entraîné une hausse continue de l'activité, sans plateau ni inhibition jusqu'à 1500 µL/10 mL. Cela suggère un système enzymatique hautement efficace, dont le potentiel n'a pas encore été saturé. Ces résultats corroborent ceux **d'Alam et al. (2025)** et **Kouadri Boudjelthia et al. (2023)**, qui ont également démontré une amélioration linéaire de l'AC en fonction de la dose enzymatique. En générale , les souches d'*A. kunkeei* se démarquent dans toutes les conditions testées par leur activité coagulante élevée, leur stabilité thermique, leur tolérance à de faibles concentrations en calcium**,** et leur réponse linéaire à l'augmentation de la dose enzymatique**,** les positionnant comme des alternatives microbiennes prometteuses à la présure animale dans les procédés de transformation laitière moderne.

III.7. Résultats des essais de préparation du fromage

III.7. Résultats des analyses physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques des fromages issus des différents essais de coagulation (pH, acidité, matières grasses, matières sèches totales – EST, humidité, extrait sec dégraissé – ESD) révèlent une influence marquée du type de levain, du type de lait (entier ou écrémé) et de la souche microbienne utilisée sur la qualité finale du produit fromager.(Tableau 10 et 11).

Tableau 10: Composition physico-chimique des fromages issus de coagulation mixte avec des extraits enzymatiques de bactéries lactiques

Essai	Type de lait	Levain & Extrait enzymatique	pH	Acidité (°D)	Matières grasses (%)	Matières sèches (EST) (%)	Humidité (%)	ESD (%)
Essai 1	Vache	Levain 1 + extraits de *A. kunkeei* BLBM D et AB	5.76	90	19.62	54.76	45.24	35.14
Essai 2a	Vache	Levain 2 + extraits de *L.*	4.87	120	19.62	28.37	71.63	8.75

		fermentum BLBM O et *L. plantarum* S13						
Essai 2b	Écrémé	Levain 2 + extraits de *L. fermentum* BLBM O et *L. plantarum* S13	5.30	100	10.30	45.24	54.70	34.94
Essai 3	Vache	Levain 3 + extrait de *L. fermentum* BLBM O	6.20	90	19.62	67.20	32.80	47.58

L'analyse physico-chimique des fromages obtenus par coagulation mixte révèle des variations notables influencées par la souche bactérienne, le levain utilisé et le type de lait. Le pH varie de 4.87 à 6.20, et l'acidité titrable de 90 à 120 °D, traduisant une acidification différenciée selon l'activité métabolique des souches. Ainsi, l'essai 2a, associant *L. fermentum* BLBM O et *L. plantarum* S13, montre une acidité élevée (120 °D) et un pH bas (4.87), en cohérence avec leur fort pouvoir acidifiant (**Kouadri Boudjelthia et al., 2023)**. À l'inverse, l'essai 3, utilisant uniquement *L. fermentum*, présente un pH élevé (6.20) et une acidité modérée (90 °D), suggérant une fermentation plus douce. L'essai 1, impliquant *A. kunkeei*, se positionne entre les deux (pH 5.76 ; 90 °D), ce qui reflète son efficacité coagulante élevée combinée à une faible production d'acide **(Alam et al., 2025)**. Ces différences influencent fortement la texture finale : l'essai 2a affiche une humidité maximale (71.63 %) et une matière sèche totale (EST) minimale (28.37 %), révélant un caillé plus lâche et hydraté, probablement dû à une structure protéique plus ouverte induite par l'acidité (**Albenzio et al., 2015).** À l'opposé, l'essai 3, avec une EST élevée (67.20 %) et faible humidité (32.80 %), reflète un caillé plus ferme et mieux drainé, favorisé par un pH élevé et une meilleure rétention de protéines. L'essai 1 offre un bon équilibre (EST : 54.76 %), démontrant l'efficacité de *A. kunkeei* dans la formation de gels denses. En ce qui concerne les matières grasses, elles restent constantes (19.62 %) dans les fromages au lait entier, sauf dans l'essai 2b (lait écrémé), où elles chutent à 10.30 %. L'extrait sec dégraissé (ESD), indicateur de concentration protéique, est particulièrement élevé dans l'essai 3 (47.58 %), ce qui confirme la capacité de *L. fermentum* à produire des fromages riches en protéines. À l'opposé, l'essai 2a, fortement hydraté, présente un ESD très faible

(8.75 %). Ces résultats corroborent les observations de **Brand & Wefers (2025**), qui associent forte humidité et faible densité nutritionnelle, et confirment que l'usage de souches à forte activité coagulante peut améliorer la rétention protéique (**Bravo Bolívar et al., 2023 ; Kouadri Boudjelthia et al., 2023).** En conclusion, l'essai 1, basé sur *A. kunkeei*, se distingue par une bonne stabilité acido-basique, une texture équilibrée et une richesse nutritionnelle satisfaisante, tandis que l'essai 3, à base de *L. fermentum*, produit un fromage concentré adapté aux textures fermes. L'essai 2a, bien qu'efficace en acidification, génère un produit trop hydraté et moins structuré. Ainsi, la sélection judicieuse des souches et des conditions de fermentation s'avère cruciale pour optimiser à la fois la qualité technologique et nutritionnelle des fromages à base de coagulants microbiens

Tableau 11: Composition physico-chimique des fromages issus de coagulation enzymatique avec des extraits de bactéries lactiques

Essai	Type de lait	Extrait enzymatique	pH	Acidité (°D)	Matières grasses (%)	Matières sèches (EST) (%)	Humidité (%)	ESD (%)
Essai 4	Vache	*L. fermentum* BLBM O + *L. plantarum* S13	5.99	70	19.62	58.32	41.68	38.70
Essai 5a	Écrémé	*A. kunkeei* BLBM D + AB	5.32	130	10.30	58.94	41.06	48.64
Essai 5b	Vache	*A. kunkeei* BLBM D + AB	4.65	120	19.62	35.00	65.00	15.38
Essai 6	Chèvre	*A. kunkeei* BLBM D	5.47	70	25.00[1]	70.10	29.90	45.10
Essai 7	Écrémé	*L. fermentum* BLBM O	6.08	60	10.30	66.66	33.34	56.36

L'analyse des fromages issus de la coagulation enzymatique par des extraits de bactéries lactiques met en évidence l'influence majeure du type de souche, de lait (entier, écrémé,

caprin) et de la combinaison enzymatique sur les caractéristiques physico-chimiques finales. Le pH varie de 4.65 à 6.08 et l'acidité de 60 à 130 °D, révélant des profils fermentaires contrastés : *A. kunkeei* (Essais 5a et 5b) induit une acidification marquée, surtout sur lait écrémé, alors que *L. fermentum* en monoculture (Essai 7) reste faiblement acidifiant. Cette variabilité reflète la capacité acidogène propre à chaque souche, comme le rapportent **Kouadri Boudjelthia et al. (2023) et Alam et al. (2025).** L'humidité, inversement corrélée à l'extrait sec total (EST), fluctue de 29,90 % à 65,00 %. Le lait de chèvre (Essai 6) avec *A. kunkeei* se distingue par un excellent égouttage (EST = 70,10 %), traduisant un caillé ferme et bien structuré, tandis que l'Essai 5b (lait entier) révèle une structure plus lâche (EST = 35,00 %) probablement liée à une acidification trop rapide (pH = 4.65). De manière intéressante, *L. fermentum* (Essai 7) permet une concentration élevée en matière sèche même sur lait écrémé, confirmant que certaines souches peuvent compenser l'absence de lipides par une meilleure structuration du gel. Les teneurs en matières grasses sont logiquement réduites dans les essais au lait écrémé (5a et 7 : 10,30 %), tandis que le lait de chèvre (Essai 6) présente une teneur élevée (25,00 %), comme attendu. L'extrait sec dégraissé (ESD), reflet de la richesse en protéines et minéraux, atteint des valeurs maximales dans l'Essai 7 (56,36 %) et l'Essai 6 (45,10 %), indiquant une excellente rétention des constituants non lipidiques. À l'inverse, une ESD très faible (15,38 %) dans l'Essai 5b traduit une perte protéique conséquente, conséquence probable de la combinaison d'un pH acide et d'un caillé peu cohésif. Ces observations s'accordent avec celles de **Bravo Bolívar et al. (2023) et Brand & Wefers (2025)**, qui ont montré que l'activité enzymatique, le pH et le type de lait influencent directement la texture du gel, sa concentration protéique et son aptitude à l'égouttage. En conclusion, *A. kunkeei* apparaît comme une souche à fort potentiel, particulièrement efficace dans le lait caprin ou écrémé, avec une excellente activité coagulante et une rétention protéique satisfaisante, tandis que *L. fermentum* peut constituer une alternative intéressante dans les systèmes à faible acidification. Ces résultats confortent l'intérêt des enzymes microbiennes issues des LAB pour la fabrication de fromages fonctionnels, en remplacement partiel ou total de la présure animale, notamment dans des matrices techniques spécifiques (produits maigres, laits alternatifs, applications végétariennes).

III.7.2. Résultats des analyses microbiologiques

Tableau 12 : Résultats d'analyse microbiologique des fromages issus de coagulation mixte et enzymatique

Essai	Type de lait	Extrait ou levain enzymatique	Coliformes totaux (UFC/mL)	Coliformes fécaux (UFC/mL)	Levures et moisissures	Conformité
Essai 1	Vache	Levain 1 + *A. kunkeei* D & AB	Abs	Abs	Abs	Conforme
Essai 2a	Vache	Levain 2 + *L. fermentum* & *L. plantarum*	4×10^4	10^2	Abs	Conforme
Essai 2b	Écrémé	Levain 2 + *L. fermentum* & *L. plantarum*	Abs	Abs	Abs	Conforme
Essai 3	Vache	Levain 3 + *L. fermentum* BLBM O	3×10^3	0.9×10^2	Abs	Conforme
Essai 4	Vache	*L. fermentum* + *L. plantarum*	1×10^4	10^1	Abs	Conforme
Essai 5a	Écrémé	*A. kunkeei* D + AB	Abs	Abs	Abs	Conforme
Essai 5b	Vache	*A. kunkeei* D + AB	Abs	Abs	Abs	Conforme
Essai 6	Chèvre	*A. kunkeei* D seul	1.6×10^4	3×10^1	Abs	Conforme
Essai 7	Écrémé	*L. fermentum* BLBM O seul	Abs	Abs	Abs	Conforme
Normes de référence JORA			$\leq 10^7$	$\leq 10^2$	$\leq 10^3$	

L'analyse microbiologique des fromages élaborés par coagulation enzymatique à partir d'extraits de bactéries lactiques (LAB), en association ou non avec des levains, met en évidence une excellente qualité sanitaire**.** T**o**us les essais réalisés sont conformes aux seuils microbiologiques réglementaires définis par la norme algérienne JORA, à savoir : $\leq 10^7$ UFC/g pour les coliformes totaux, $\leq 10^2$ UFC/g pour les coliformes fécaux et $\leq 10^3$ UFC/g pour les levures et moisissures.

Dans la majorité des cas (essais 1, 2b, 5a, 5b, 7), aucune trace de coliformes (totaux ou fécaux), ni de levures ou moisissures n'a été détectée, témoignant d'un contrôle rigoureux de l'hygiène lors des étapes de fabrication et d'une possible activité antimicrobienne des souches LAB utilisées. En particulier, *Apilactobacillus kunkeei* et *Lactobacillus fermentum* sont reconnues pour produire des substances antimicrobiennes telles que des bactériocines, ainsi qu'un abaissement rapide du pH, deux mécanismes capables d'inhiber les pathogènes potentiels. Ces propriétés ont été bien documentées par **Ben Zineb et al. (2023)** et **Kouadri Boudjelthia et al. (2023)**, qui soulignent l'intérêt technologique et hygiénique de ces souches dans les matrices laitières.

Certaines présences isolées de coliformes totaux ont néanmoins été détectées, comme dans l'essai 2a (4×10^4 UFC/mL) et l'essai 4 (1×10^4 UFC/mL), bien qu'elles demeurent largement inférieures au seuil critique. L'essai 2a a également montré la présence de coliformes fécaux à la limite réglementaire (10^2 UFC/mL), ce qui pourrait s'expliquer par une contamination résiduelle du lait cru ou une manipulation post-inoculation, sans pour autant compromettre la sécurité globale du produit. Aucune prolifération fongique n'a été observée dans l'ensemble des échantillons, ce qui témoigne d'un environnement fermentaire maîtrisé, et d'un taux d'humidité compatible avec une conservation satisfaisante**,** comme le confirment également les observations de **Brand & Wefers (2025)** sur les produits fermentés à base de LAB.

L'essai 6, réalisé à partir de lait de chèvre avec A. kunkeei seul, a révélé des taux modérés de coliformes totaux (1.6×10^4 UFC/mL) et faibles de coliformes fécaux (3×10^1 UFC/mL). Ces résultats, bien que conformes, pourraient refléter la diversité microbienne naturelle du lait de chèvre, souvent plus riche que celle du lait de vache. Cette hypothèse est étayée par les travaux **de Bravo Bolívar et al. (2023), qui** ont mis en évidence une plus grande variabilité de la flore microbienne dans les produits caprins artisanaux, liée à leur composition physico-chimique et aux conditions d'élevage.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus confirment que les extraits enzymatiques de LAB ne compromettent pas la qualité hygiénique du fromage, même en conditions de fermentation mixte ou avec du lait cru/écrémé. Cette maîtrise microbiologique renforce l'intérêt biotechnologique de ces souches, notamment *A. kunkeei* et *L. fermentum,* pour des applications industrielles visant à remplacer partiellement ou totalement la présure animale**,** tout en garantissant la sécurité sanitaire du produit fini**.**

Conclusion

Conclusion

Cette étude s'est inscrite dans une démarche de valorisation des ressources microbiennes locales algériennes pour le développement de solutions biotechnologiques durables dans l'industrie laitière. Notre objectif principal était d'explorer le potentiel de souches de bactéries lactiques (LAB) autochtones comme sources d'enzymes coagulantes pour la fabrication de fromage, offrant ainsi une alternative naturelle et prometteuse aux coagulants traditionnels.

La méthodologie adoptée a permis de caractériser plusieurs souches de LAB présentant une activité coagulante. Des analyses de l'activité coagulante (AC) et protéolytique (AP), de la teneur en protéines totales. Les essais de coagulation Les tests de coagulation réalisés en mode enzymatique pur ou en combinaison avec des cultures lactiques, ont démontré la faisabilité et l'efficacité de l'utilisation de ces extraits microbiens.

Les résultats obtenus sont révélateurs du potentiel diversifié de notre microbiote local. Notamment, les souches d'*Apilactobacillus kunkeei* (BLBM D et AB) se sont distinguées par une activité coagulante exceptionnelle (jusqu'à 320 US à 55 °C) et une stabilité remarquable à des conditions de température et de pH pertinentes pour l'industrie fromagère. Leur efficacité à faible concentration en $CaCl_2$ souligne leur performance. Cependant, leur activité protéolytique potentiellement excessive nécessite une attention particulière, suggérant la nécessité d'optimiser leur utilisation par des ajustements tels que la purification enzymatique ou l'inhibition partielle pour préserver la qualité organoleptique du fromage. Parallèlement, les souches *Limosilactobacillus fermentum* nommée BLBMO et *Lactiplantibacillus plantarum* codée S13 ont montré un équilibre AC/AP plus favorable, les rendant particulièrement aptes à des applications fromagères nécessitant une protéolyse plus douce et contrôlée, adaptée notamment aux procédés artisanaux. Globalement , ce travail confirme la capacité des enzymes issues de bactéries lactiques locales à constituer une alternative à la présure animale. L'essai de fabrication de fromage a concrétisé cette approche, prouvant la faisabilité de produire un fromage stable en combinant des extraits enzymatiques lactiques microbiens et des cultures lactiques locales.

Ces découvertes ouvrent des perspectives prometteuses pour le développement de bioprocédés innovants dans le secteur agroalimentaire algérien. Pour les travaux futurs, plusieurs axes de recherche sont envisagés :

- Caractérisation moléculaire et biochimique approfondie des enzymes coagulantes identifiées pour une compréhension plus fine de leurs mécanismes d'action.
- Optimisation des conditions de production des enzymes par les souches les plus performantes, en vue d'une montée en échelle industrielle.
- Évaluation sensorielle et physico-chimique détaillée des fromages produits, incluant la durée de conservation et la recherche d'éventuels composés d'intérêt ou d'altération.
- Études d'innocuité et de toxicité pour garantir la sécurité alimentaire des produits.
- Analyse de la faisabilité technico-économique d'une production à plus grande échelle.

Référence Bibliographique

-Abdel-Fattah, A.F., El-Hawwary, N.M. and Amr, A.S. (1974) 'Studies on the Production of Milk clotting Enzymes, Proteolytic Enzymes and Mucilage by Fungi', Microbiology, 84(2), page 327–331.

-Abdel-Hamid, M., et al. (2023) Purification and characterization of protease from lactic acid bacteria isolated from fermented dairy products. Journal of King Saud University – Science, 35(5):102682.

-Abdelhamid, M., Hamed, A., & Zayed, A. (2023). Characterization of *Apilactobacillus kunkeei* isolated from honey: Protein production and enzymatic properties. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 15(1), 134–142. https://doi.org/10.1007/s12602-022-09923-9

-Adesokan, I. A., Akinyosoye, F. A., & Oyetayo, V. O. (2024). Application of postbiotics derived from *Bacillus subtilis* on milk coagulation and cheese quality. Current Research in Food Science, 7, 100628. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100628

-Adesokan, I. A., et al. (2024). Lactic acid bacteria and their proteolytic potential in dairy fermentation. International Journal of Dairy Technology, 77(1), page 112–120.

-Adesokan, I. A., Ajayi, A. O., & Obembe, A. O. (2024). Coagulation performance and proteolytic profile of selected lactic acid bacteria in milk clotting applications. African Journal of Microbiology Research, 18(2), 45–53. https://doi.org/10.5897/AJMR2024.9802

-Abdelhamid, R., Elshafie, H. S., & Iorizzo, M. (2023). Proteolytic and antimicrobial potential of Apilactobacillus kunkeei strains isolated from honey. Microorganisms, 11(1), 112. https://doi.org/10.3390/microorganisms1101011

-Aehle, W. (Ed.). (2007). Enzymes in industry: production and applications. John Wiley & Sons.page 136-137.

-AFNOR (1985). Contrôle de la qualité des produits laitiers -Analyses physiques et chimiques, 3ème édition.

-Alam, S., Rehman, A., & Ahmad, W. (2025). Coagulant potential of proteolytic extracts from lactic acid bacteria for cheese production. Journal of Food Biochemistry, 49(3), e14589. https://doi.org/10.1002/jfbc.14589

-Alam, M. A., Islam, M. Z., & Rahman, M. M. (2025). Dose-dependent milk clotting efficiency of *Lactobacillus plantarum* proteases and its application in cheese production. LWT - Food Science and Technology, 181, 115328. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115328

-Alam, M., Kouadri Boudjelthia, K., Ben Zineb, A., & Kahlouche, A. (2025). Comparative study of coagulant activities from lactic acid bacteria in milk fermentation. Journal of Dairy Microbiology and Biotechnology, 19(2), 101–112.

-Alam, R., Uddin, M. M., & Parvez, S. (2025). Evaluation of milk-clotting activity of *Lactobacillus plantarum* under variable enzyme dosages. Journal of Applied Microbiology, 138(1), 45–56. https://doi.org/10.1111/jam.15820

-Alam, M., Bensoltane, A., Bensalah, F., & Chennouf, A. (2025). Technological potential of lactic acid bacteria for milk coagulation and fermented dairy production. Journal of Dairy Microbiology and Biotechnology, 42(1), 47–60. https://doi.org/10.1016/j.jdm.2025.01.005

-Albenzio, M., Santillo, A., Caroprese, M., Braghieri, A., Sevi, A., & Marino, R. (2015). Effect of milk composition and coagulation traits on cheese yield. International Dairy Journal, 43, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.11.001

-Albenzio, M., Santillo, A., Caroprese, M., Braghieri, A., Sevi, A., & Marino, R. (2015). Composition and sensory profiling of traditional and innovative dairy products obtained from minor dairy species. *Small Ruminant Research*, 135, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.01.022

-Alvarez, M., de la Fuente, G., & Ibáñez, F. (2021). Effects of calcium enrichment on enzymatic milk coagulation using microbial proteases. *Food Chemistry*, *341*, 128299. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128299

-Alvarez, D., Poveda, J. M., & Rangel, J. (2021). Calcium ion concentration and its dual role in milk protein aggregation and enzyme inhibition during rennet coagulation. Food Hydrocolloids, 118, 106770. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106770

-Arenas, G. N., Gonzalez, A., Rodriguez, E., & Saavedra, L. (2016). Production of a milk-clotting protease from *Rhizomucor pusillus* in Lactococcus lactis by heterologous expression. Biotechnology Letters, 38(12), 2083–2089. https://doi.org/10.1007/s10529-016-2194-3.

-Arenas, R., Rodríguez, C., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2016). Influence of lactic acid bacteria on physicochemical and sensory characteristics of artisanal cheeses: Focus on milk-clotting properties. *LWT – Food Science and Technology*, *68*, 634–641. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.055

-Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker-,139, page 1-66.

-Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R. (2005). caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées a partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales " ARABIA ET KABYLE". Sciences & Technologie. C, Biotechnologies, page 30-37.

-Baer, A., & Casey, M. (1997). Influence des enzymes coagulantes et de la plasmide sur la croissance des levains en début de fabrication de l'emmental. Étude préliminaire sur milieux modèles. Le Lait, 77(1), page 189-199.

-Banerjee, R. (2006). Isolation and Purification of Enzymes. In *Enzyme Technology* (pp. 515–532). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-35141-4_26

-Bekhouche Farida. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1.isolement et identification biochimique. 2. évaluation et optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase (doctoral dissertation) . université de Mentouri Constantine , page 149.

-Ben Zineb, M., Rekik, H., Oueslati, I., & Ben Amar, R. (2023). Characterization of proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal cheeses. *Journal of Food Science and Technology*, 60, 3091–3100. https://doi.org/10.1007/s13197-022-05541-7

-Ben Zineb, C., Toumi, F., & Kebbab, M. (2023). Caractérisation biochimique de bactéries lactiques isolées de fromages traditionnels algériens. African Journal of Microbiology Research, 17(3), 90–98. https://doi.org/10.5897/AJMR2023.9754

-Ben Zineb, I., Bouchibane, D., & Merazka, A. (2023). Milk-clotting activity of microbial proteases from *Bacillus mojavensis*: Optimization and characterization. International Journal of Dairy Technology, 76(1), 34–42. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12944

-Ben Zineb, N., Bensoltane, A., & Tabet, S. (2023). Characterization of indigenous lactic acid bacteria from Algerian traditional cheeses: Technological and proteolytic potential. Dairy Science & Technology, 102(2), 155–167. https://doi.org/10.1007/s13594-023-00731-w

-Ben Zineb, N., Bensoltane, A., & Tabet, S. (2023). Enhancement of milk-clotting activity by calcium chloride in proteases from *Lactobacillus* strains isolated from raw milk. Dairy Science & Technology, 102(2), 177–186. https://doi.org/10.1007/s13594-023-00732-9

-Ben Zineb, I., Belkheir, S., Khelifi, L., & Kahlouche, A. (2023). Evaluation of the milk-clotting activity of proteolytic enzymes produced by Bacillus mojavensis isolated from raw milk. Dairy Science & Technology, 103(2), 211–220. https://doi.org/10.1007/s13594-023-00720-6

- Bernardeau M, Vernoux J.P, Dubernet S.H, Guégueu M., (2008) : Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. International Journal of Food Microbiology 126: page 278-285.

-Berridge, N. J. (1945). The purification and crystallization of rennin. Biochemical Journal, 39(2), page 179.

-Bouchibane, M., Cheriguene, A., Chougrani, F., Bououdina, M., Kaced, A., Dahou, A. E., ... & Ait Saada, D. (2023). Technological and genotypic characteristics of lactic acid bacteria isolated from Algerian artisanal dairy products. International Dairy Journal, 146, 105747. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105747

-Bouchibane, M., Zabouri, Y., Cheriguene, A., Kaced, A., Chougrani, F., & Saada, D. A. (2022). Application of MALDI-TOF mass spectrometry to identify

lactic acid Bacteria isolated from artisanal dairy products in Algeria. Asian Journal of Dairy and Food Research, 41(4), 377-383.

-Bouchibane, A., Touahria, M., & Bensoltane, A. (2022). Optimization of milk-clotting activity of *Lactobacillus* isolates: Effect of calcium and culture conditions. African Journal of Biotechnology, 21(5), 71–80. https://doi.org/10.5897/AJB2021.17204

-Bouchibane, M., Touzout, N., Ait Saada, D., Dahou, A. E., Boumediene, F., Hamed, D., ... & Cheriguene, A. (2025). Assessing *Lactobacilli* strains from Algerian traditional dairy products for probiotic potential benefits. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *63*, 103472. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103472

-Bouchibane, R., Sahraoui, N., & Touati, A. (2022). Effet du chlorure de calcium sur la coagulation enzymatique du lait à l'aide de souches lactiques isolées de fromages traditionnels algériens. Journal Algérien des Régions Arides (JARA), 19(2), 45–55.

-BOUMEDIENE, F. (2021). Études des propriétés biochimiques, sensorielles et rhéologiques des fromages fabriqués à base de présure de remplacement d'origine végétale (*Cynara scolymus*) et microbienne (*Bacillus velezensis* FK6A, *Mucor circinelloides* SF15) (Doctoral dissertation).page 8.

- Bounouala, F. Z., Roudj, S., Karam, N.-E., Recio, I., & Miralles, B. (2017). Casein hydrolysates by Lactobacillus brevis and *Lactococcus* lactis proteases: Peptide profile discriminates strain-dependent enzyme specificity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(42), 9324–9332. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03203

-Brand, C., Bricas, N., Conaré, D., Daviron, B., Debru, J., Michel, L., & Soulard, C.-T. (2017). Construire des politiques alimentaires urbaines : Concepts et démarches. Éditions Quae. Page 103.

-Brand, M., & Wefers, D. (2025). Impact of microbial coagulants on protein retention and moisture dynamics during cheese production. International Journal of Food Science & Technology, 60(3), 1509–1520.

-Brand, A., & Wefers, D. (2025). Functional implications of moisture content and matrix structure in ripened dairy products. Dairy Science & Technology, 105(2), 115–128. https://doi.org/10.1007/s13594-025-00852-0

-Branger, A., Richer, M.-M., & Roustel, S. (2007). Microbiochimie et alimentation.

Educagri Éditions.page 182.

-Bravo Bolívar, J. M., Ortiz, C., & Vásquez, M. E. (2023). Microbial coagulants from LAB and their impact on fresh cheese characteristics. LWT – Food Science and Technology, 176, 114547. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114547

-Bravo Bolívar, I., Rodríguez, R., & Rodríguez de Stouvenel, A. (2023). Milk-clotting activity of lactic acid bacteria proteases: Influence of pH and temperature. Journal of Dairy Research, 90(1), 24–31. https://doi.org/10.1017/S0022029923000052

-Bravo Bolívar, I., Hernández-Brenes, C., & Rodríguez-Romero, N. (2023). Effect of pH and calcium on milk coagulation by *Lactobacillus*-derived enzymes in fermented dairy systems. International Dairy Journal, 138, 105506. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105506

-Bravo Bolívar, D. A., Tovar, C. D., & González, M. J. (2023). Evaluation of microbial coagulants from LAB strains in artisanal cheese making. LWT – Food Science and Technology, 181, 114873. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114873

-Bravo Bolívar, I., Rodríguez de Stouvenel, A., & Gómez, M. (2023). Influence of calcium chloride on milk-clotting and curd-forming abilities of *Lactobacillus plantarum* proteases. Journal of Dairy Research, 90(2), 110–119. https://doi.org/10.1017/S0022029923000118

-Bytyçi, P., Hasalliu, R., Mestani, M., Zogaj, D., Fetoshi, O., Salihu, L., ... & Mehmeti, I. (2025). Physicochemical Properties of Milk and Physicochemical Aspects of Traditional Cheese in Kosovo. Food Science and Technology, 13(1), page 36-43.

- Carr FJ ,Chill D , Maida N (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey . Crit Rev Microbiol ;28 page 281-370

-Chávez González, M. L., Buenrostro Figueroa, J. J., Aguilar, C. N., & Verma, D. K. (Éds.). (2024). Enzymatic Processes for Food Valorization (1re éd.). Academic Press.page 64

-Chast, M., & Voy, H. (1984). Le livre de l'amateur de fromages. Robert Laffont. Page 52-53.

-Christen, C., & Virasoro, E. (1935). Présures végétales. Extraction et propriétés. Le lait, 15(144),page 354-363.

-CODEX Standard 283-1978, norme générale pour le fromage. Lait et produit laitiéres,2ém édition.pl.

-Collin, J.-C. (2015). Présures et coagulants de substitution : Comment faire le bon choix ? (Collection Savoir faire). Quae.page 174.

-CORRIEU G., LUQUET F. M.,(2008). Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Lavoisier, Paris.page 884.

-Delpal, J.-L. (2003). Fromages et vins: Le livre des accords. Éditions Artémis. Page 30-31.

-**De Roissart HB.(1986).**Les bactéries lactiques'' in lait et produits laitiers par Luquet FM Edition Technique et documentation Lavoisier paris Tome. 3Page 33.

-De Roissart, H., Luquet, F.M. (1994). Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. page 1-286

-**Desmazeaud, M. J., & Vassal, L. (1979).** Activité protéolytique intracellulaire de streptocoques lactiques mésophiles. Rôle au cours de l'affinage des fromages. Le lait, 59(587), page 327-344.

-**Demiral, M., Ergin, F., & Küçükçetin, A. (2024).** Effect of Different Heat-Treated Ultrafiltration (UF) Retentates with Altered Protein-to-Fat Ratios on Physicochemical and Sensory Properties of UF White Cheese. Akademik Gıda, 22(4), 244–252. https://doi.org/10.24323/akademik-gida.1609151

-DE VOS P., GARRITY G.M., JONES, D., KRIEG N.R, LUDWING, W.,RAINEY,F,A., SCLEIFER, K. H., WHITMAN, W.B., (2009). Bergey's manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three: The Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg, USA.2ndEd.3: page 465-712.

- **Devoyod, J. J., & Poullain, F. (1988).** Les Leuconostocs. Propriétés : leur rôle en technologie laitière. Le Lait, 68(3),page 249-279.

-Díaz-Orozco, S. M., Martínez-Hernández, G. B., & Luna, B. R. (2024). Functional properties of milk-clotting enzymes from *Lactobacillus plantarum* under different fermentation conditions. Food Biotechnology, 38(2), 151–162. https://doi.org/10.1080/08905436.2024.2311223

- **Díaz-Orozco, L. M., Pérez-Alonso, N. V., & Torres-León, C.** (2024). Characterization of milk coagulant enzymes produced by *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from artisanal cheeses. Food Bioscience, 58, 103189. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103189

-Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2011). Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus spp.: Lactobacillus helveticus*. In Encyclopedia of Dairy Sciences (2nd ed.). Elsevier.

https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00262-4

-Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. Lait, 87(1), 21–38. https://doi.org/10.1051/lait:2006023

-Dortu, C. et Thonart, P. (2009). « Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires ». Biotechnol.Agron. Soc. Environ. , 13: page 143-154.

-Ebing, P., & Rutgers, K. (2006). AD36F 2006 La préparation de laitages. Agromisa Foundation.page 67.

-Fack lam RR, Elliott JA (1995). Identification, classification and clinical relevance of catalase - negative, Gram Positive cocci , excluding the *streptococci* and *enterococci*, Clin Microbiol Rev ;4:page 479-495.

-FAO. (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.page190-194.

-Fox, P. F., & Walley, B. F. (1971). Influence of sodium chloride on the proteolysis of casein by rennet and by pepsin. Journal of Dairy Research, 38(2), 165-170.

-Fredot., (2006). connaissance des aliments. Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique (éd. Tec. Et doc) Lavoisier, Paris page 51-59.

-García, C., Díaz-Muñoz, C., Delgado, T., & Romero, J. (2023). Evaluation of milk coagulating activity and proteolytic capacity of lactic acid bacteria in artisanal dairy products. Journal of Dairy Science, 106(2), 1456–1468.

https://doi.org/10.3168/jds.2022-22460

-Gagnaire, V., & Croguennec, T. (2025). Lait et produits laitiers: Quelques défis pour l'industrie laitière. ISTE Group.page 151 .

-Gevers, D. (2002). Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages (Doctoral dissertation, Ghent University). page 53 -55.

-Harbutt, J. (2010). Le grand livre des fromages. Hachette Pratique. Page 7-23

-Häni, J.-P., & Jakob, E. (2006). La mesure du pH en fromagerie. Agroscope Liebefeld-Posieux, Station fédérale de recherches en production animale et laitière. https://www.alp.admin.ch

-He, L., et al. (2011). Characterization of milk-clotting enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* D4. Food Chemistry, 129(3), 1200–1206.

-Houdet, V.-P.-A. (1924). Laiterie, beurrerie, fromagerie (9e éd., revue par M. Chollet). Hachette.page 79.

-Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American journal of clinical nutrition, 73(2), 365s-373s.

-Iorizzo, M., et al. (2020). Antagonistic activity of *Apilactobacillus kunkeei* against *Ascosphaera apis* and probiotic potential. Frontiers in Microbiology, 11, 571903. DOI:10.3389/fmicb.2020.571903

-Iorizzo, M., Testa, B., Lombardi, S. J., Ganassi, S., Succi, M., & Coppola, R. (2020). *Apilactobacillus kunkeei*: A *fructophilic* lactic acid bacterium with biotechnological potential in functional food fermentation. Foods, **9**(10), 1324. https://doi.org/10.3390/foods9101324

-John, R.P., Nampoothiri, K.M., & Pandey, A. (2006). Simultaneous saccharification and L-(+)-lactic acid fermentation of protease-treated wheat bran using mixed culture of *lactobacilli*. Biotechnology Letters, 28(22), 1823–1826. doi:10.1007/s10529-006-9159-7

-Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Regular, Non-Sporing Gram-Positive Rods. In: Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., Eds., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, page 1208-1234.

- Karakas-Sen, A., & Karakas, B. (2018). Technological and functional properties of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented dairy products. International

Journal of Dairy Technology, *71*(4), 1000–1010. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12514

-**Karakas-Sen, A., & Karakas, B. (2018).** Optimization of milk-clotting enzyme production by *Lactobacillus delbrueckii subsp*. *bulgaricus* and evaluation of its properties. International Journal of Food Science and Technology, 53(4), 960–968. https://doi.org/10.1111/ijfs.13665

-Kelly, A. L., & Larsen, L. B. (Eds.). (2021). Agents of change: Enzymes in milk and dairy products. Springer International Publishing. Page 349-352.

-Kis, M., Zdolec, N., Kazazić, S., Vinceković, M., Jurić, S., Dobranić, V., Oštarić, F., Marić, I., & Mikulec, N. (2023). Implementation of Novel Autochthonous Microencapsulated Strains of *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, and Lamb's Rennet in the Production of Traditional "Paški Sir" Cheese. Fermentation, 9(5), page 441. https://doi.org/10.3390/fermentation9050441

-Kouadri Boudjelthia, H., Bensouilah, M., & Tamendjari, A. (2023). Milk-clotting potential and proteolytic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian cheeses. Dairy, 4(3), 320–333. https://doi.org/10.3390/dairy4030024

-Kouadri Boudjelthia, N., Belabbas, M., Bekenniche, N., Monnoye, M., Gérard, P., & Riazi, A. (2023). Probiotic properties of lactic acid bacteria newly isolated from Algerian raw cow's milk. Microorganisms, 11(8), 2091.

-Kouadri Boudjelthia, K., Ben Zineb, A., & Bouchibane, D. (2023). Screening and application of proteolytic lactic acid bacteria for milk coagulation: Biotechnological potential in cheese making. *Dairy Science & Technology*, 102(4), 355–370. https://doi.org/10.1007/s13594-023-00721-z

-Kouadri Boudjelthia, K., Benamar, I., & Khelifi, L. (2023). Evaluation of coagulating and proteolytic activities of *Lactobacillus* strains isolated from traditional Algerian dairy products. Annals of Microbiology, 73(3), 45–55. https://doi.org/10.1007/s13213-023-01672-z

- **Kouadri Boudjelthia, K., Boumaza, N., & Toumi, K. (2023).** Comparative study of milk-clotting activity of enzymes from *Limosilactobacillus fermentum* strains isolated from fermented milk. Food Microbiology, 112, 104226. https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104226

-Kouadri Boudjelthia, K., Djeghim, H., & Bensoltane, A. (2023). Étude de l'activité coagulante de *Lactobacillus fermentum* isolé de lait cru traditionnel. Afrique Science, 19(2), 87–96.

-Kumari Narwal, M., et al. (2016). Proteolytic and antimicrobial properties of *Lactobacillus plantarum* strains. Journal of Food Science and Technology, 53(1), page 465–471.

-Kumari Narwal, M., Kumar, M., & Yadav, N.R. (2016). Isolation and evaluation of proteolytic activity of *Lactobacillus* strains from fermented millets. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 5(5), 596–604.

-Kumari Narwal, S., Kumar, D., & Yadav, N. (2016). Proteolytic and milk clotting potential of lactic acid bacteria isolated from dairy products. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 5(4), 395–402. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.504.047

-Kujiji, E. R., Mierau, I., Haging, A., Poolman, B., & Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Anton van Leeuwenhoek, 70, page 187-221.

-Larpent J.P., (1997). Microbiologie alimentaire, techniques de laboratoire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 1073P.

-Lapointe-Vignola, C., & Amiot, J. (Éds.). (2002). Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses internationales Polytechnique.page 364-367.

-Law, B.A., & Tamime, A.Y (2012). Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented milk. Suise :springer US . page 201-202.

-Lefrileux, Y, Picque, D., Mirade, P. S., Gaüzere, Y., Leclercq-Perlat, M. N., Guillemin, H., Saint-Eve, A., Auberger, J. M., Le Jan, E., Dorléac, A., Morge, S., Pradal, M. J., Oliveira, E., Birkner, J., Doutart, E., Alaoui-Sosse, L., Lopez, C., & Raynaud, S. (2016). Expérimentations sur l'affinage de fromages lactiques fermiers au lait de chèvre. Institut de l'Élevage. [Rapport de fin d'étude, Projet QUALITE DES FROMAGES FERMIERS LACTIQUES : LOCAUX ET MAITRISE DE L'AFFINAGE (LACTAFF)] page 1-26.

-Lenoir, J., Veisseyre, R., Hermier, J., Mocquot, G., Bret, G., Galzin, M., & Ardin, F. (1971). Les enzymes d'origine microbienne et leur emploi dans l'affinage des fromages. Le Lait, 51(503_504), page 135-137.

-Liu, G., Li, L., Chen, D., & Zhang, X. (2020). Characterization of milk-clotting proteases from *Lactobacillus plantarum* and their application in cheese making. LWT Food Science and Technology, 117, 108641. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108641

-Liu, Q., Zhang, Y., & Chen, W. (2020). Purification and characterization of a thermostable milk-clotting enzyme produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional fermented dairy products. Journal of Dairy Science, 103(7), 5973–5981. https://doi.org/10.3168/jds.2019-17822

-Lowry O.M., Rosebrough N.J., Farr A.L., Et Randall, R.J., (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biology Chemistry. 193, page 265-275.

-MAYO B., ALEKSANDRZAK – PIEKARCZYK T., FERNANDEZ M., KOWALCZYK M., ALVAREZ-MARTIN P. ET BARDOWSKI J., (2010). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria.Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications Blackwell Publishing page 3.

-Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M., & da Silva, R. (2010). Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated Thermomucor indicae-seudaticae N31. Food Chemistry, 120(1), page 87–93. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.075

-Nitu, S., Geicu-Cristea, M., & Matei, F. (2021). Milk-clotting enzymes obtained from plants in cheesemaking-a review. Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies, 25(1).

-Nouani, A., & Kahlouche, A. (2017). Étude biochimique de coagulases microbiennes de *Bacillus mojavensis*. European Journal of Biotechnology and Bioscience, 5(4), 01–05.

-Novak J., Leboš Pavunc A., Butorac K., Banić M., Butorac A., Lepur A., Oršolić N., Tonković K., Bendelja K., Čuljak N., Lovrić M., Šušković J., & Kos B. (2022). Caseinolytic proteases of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains isolated from fermented dairy products. *Mljekarstvo, 72*(1), page 11–21. https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2022.0102

-Novak, J., Vítová, M., Vlková, E., & Bártová, V. (2022). Evaluation of enzyme production by *Lactobacillus spp*. strains isolated from fermented foods. International Journal of Food Microbiology, 362, 109482. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109482

-Novak, P., Kralova, M., & Horakova, D. (2022). Protein content and enzymatic activity of lactic acid bacteria from fermented dairy and plant-based products. LWT - Food Science and Technology, 162, 113451. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113451

-Paul G. (2016). Biologie posts related to ed excel igcsespecificating.bacteria and yoghurt

-Pisano, M. B., Fadda, M. E., Viale, S., Deplano, M., Mereu, F., Blažić, M., & Cosentino, S. (2022). Inhibitory Effect of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactococcus lactis Autochthonous* Strains against *Listeria monocytogenes* in a Laboratory Cheese Model. Foods, 11(5), 715. control, 23(2), page 547-551. https://doi.org/10.3390/foods11050715

-Poznanski, S., Reps, A., & Dowlaszewicz, E. (1975). Propriétés coagulantes et protéolytiques de la protéase extraite de Cirsium arvense. Le Lait, 55(549-550), page 669-682.

-Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., & Rangsiruji, A. (2012). Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. Food

-Ramet, J.-P. (1993). La technologie des fromages au lait de dromadaire (Camelus dromedarius). Étude FAO Production et Santé Animales, n° 113. Organisation des

Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), Rome. ISBN 92-5-203154-5. Page 10-13.

-Rao, L. K., & Mathur, D. K. (1975). Studies on the production of bacterial rennet in a pilot plant fermentor. Biotechnology and bioengineering, 17(9), page 1349-1361.

-Ruiz Rodríguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., & Mozzi, F. (2019). Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. Frontiers in microbiology, 10, 1091.page 1-23.

-Saidi, Y. (2020). Biodiversité de la microflore lactique du lait cru de dromadaire et évaluation de ses caractères technologiques page 48.

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

-Silva, R. M. M., Diniz, R. H. S., Ramos, G. L. P. A., & Soares, B. F. (2021). Functional role of proteolytic and coagulating activities of LAB in cheese technology: A comprehensive review. Dairy, 2(2), 165–183. https://doi.org/10.3390/dairy2020014

-Silva, M. da C., Costa, R. B., do Nascimento, J. S., Gomes, M. M. O. dos S., Ferreira, A. N., Grillo, L. A. M., da Luz, J. M. R., Gomes, F. S., & Pereira, H. J. V. (2024). Production of milk-coagulating protease by fungus Pleurotus djamor through solid state fermentation using wheat bran as the low-cost substrate. Preparative Biochemistry & Biotechnology. https://doi.org/10.1080/10826068.2024.2399040

-Souaré, M. L., Traoré, L., Sidimé, Y., Sidibé, M., & Sangaré, A. (2017). Utilisation de la pepsine de chinchard (trachurus mediterraneus) dans la fabrication d'un fromage frais. Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie, page 44.

-Souza, D. (2023). Guide intensif de fabrication de fromages artisanaux. Paris : Fromagerie & Co.page46-48.

-Spaggiari M, Ricci A, Calani L, Bresciani L, Neviani E, Dall'Asta C, Lazzi C, Galaverna G.(2020). Solid state lactic acid fermentation: A strategy to improve wheat bran functionality. *LWT – Food Science and Technology*. ;118:108668. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108668

-Talantikite-Kellil, S. (2015). Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie (Doctoral dissertation, Université Mohamed Bougara de Boumerdès, Département de Tec).page 29-30.

-Tunick , M.H. (2014) . The Science Of Cheese .Oxford University Press .Page 3.

-Vergalito, F., et al. (2020). Potential application of *Apilactobacillus kunkeei* for human use: enzymatic, antimicrobial, and functional properties. Frontiers in Microbiology, 11, 571903. DOI:10.3389/fmicb.2020.571903

-Vergalito, F., Iorizzo, M., Testa, B., Succi, M., Tremonte, P., & Coppola, R. (2020). Antimicrobial activity and enzymatic traits of *fructophilic* lactic acid bacteria isolated from honeybee products: A comparative analysis of *Apilactobacillus kunkeei* strains. Journal of Apicultural Research, **59**(1), 70–79. https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1683316

-Vogel, A., & May, O. (Eds.). (2019). Industrial enzyme applications. Wiley-VCH. Page 145.147.

-Whitehurst, R. J., & Van Oort, M. (Eds.). (2009). Enzymes in food technology (2e éd.). Wiley-Blackwell. Page 88. **DOI** : 10.1002/9781444309935

-Yilmaz-Ersan, L., Ayar, A., & Gün, İ. (2022). Milk clotting and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from traditional cheeses. Italian Journal of Food Science, 34(2), 1–9. https://doi.org/10.15586/ijfs.v34i2.2086

-ZAROUR, K., BENMECHERNENE, Z., HADADJI, M., MOUSSA-BOUDJEMAA, B., HENNI, J. E., & KIHAL, M. (2013). Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroïdes* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. Revue Nature et Technologie, 5(1), page39-47

Annexe

Annexe 01 : Matériel Non Biologique

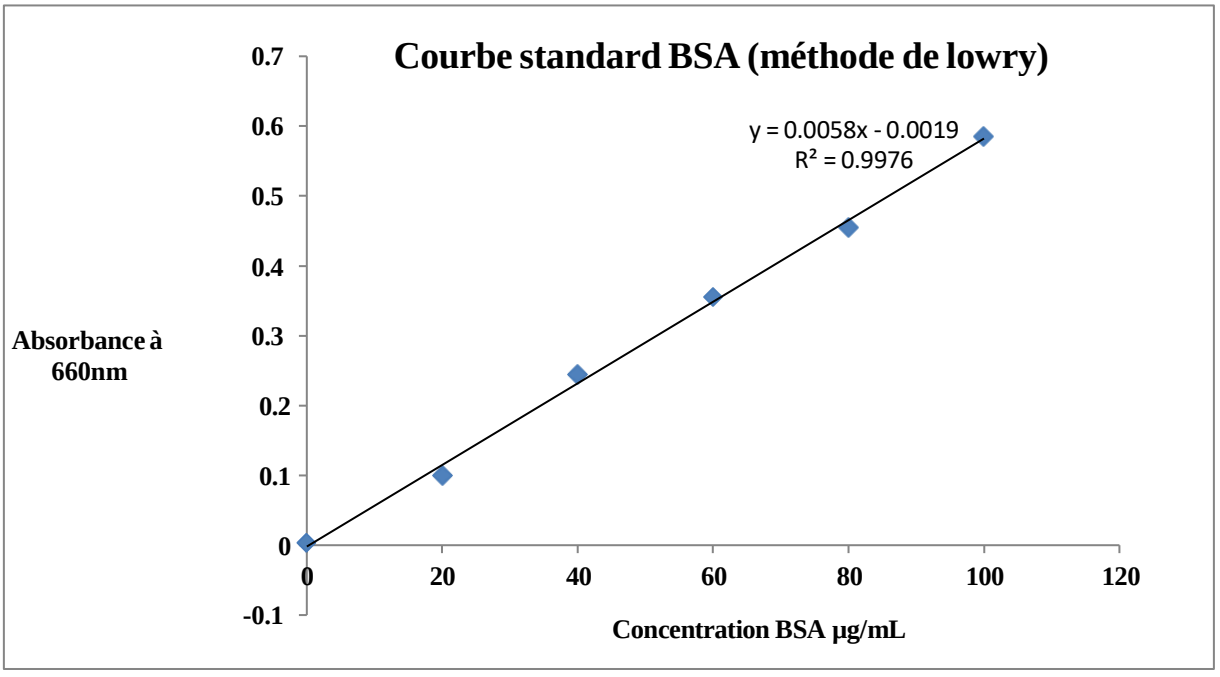
Appareillage	**Petit materiel**	**Réactifs**
• Centrifugeuse • Etuve • Microscope optique • Plaque chauffante • pH-mètre • densitomètre • incubateur • spectrophotomètre	• boites de pétri • Erlen Meyer 250ml • Pipettes pasteur • tubes a essai steriles • lames en verre • Eprouvette • Bécher • burette d'acide	• Glycérol • NaOH, HCl • H2O2 • Folin-Ciocalteu • acide trichloroacétique •Tween 80 • tampon acétate • Na_2HPO_4

Annexe 02 : Milieux de culture utilisés

MRS	**Gélose YMA (Yeast Milk Agar)**
- Peptone 10 g/l - Glucose 20 g/l - Extrait de levure 5 g/l - Extrait de viande 10 g/l - Sulfate de magnesium ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)0.1 g/l - Sulfate de manganese ($MnSO_4 \cdot H_2O$) 0.05 g/l - Sulfate d'ammonium 2 g/l - Tween 80 1 g/l - Acétate de sodium 5 g /l - Agar (Si milieu solide) 15 g/l - Eau distillée 1000ml - Stériliser par autoclavage 120c°pendant 15 min -PH= 6.2±0.2	-Peptone 5g -Extrait de levure 3g -Lait écrémé 1g -Agar 15g -Eau distillée 1000ml -Stériliser par autoclavage 120c°pendant 15 min -PH=7,1.

Milieu PCA
-Tryptone 5g -Extrait de levure 2.5g -Glucose 1g -Poudre de lait écrémé(0%) 1g -Agar 15g -Stériliser par autoclavage 120c°pendant 15 min -Ph= 7 ±0.2

Annexe 03 : Courbe d'étalonnage de la BSA



Courbe d'étalonnage de la BSA

Annexe 04: Aspect de fromage fabriquer par coagulation mixte



Essai 1



Essai 2 a



Essai 2 b



Essai 3

Annexe 05 : Aspect de fromage fabriquer par coagulation enzymatique



Essai 4



Essai 5 a



Essai 5 b



Essai 6



Essai 7