

Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Extraction et caractérisation des paramètres
influençant la coagulation du lait par La ficine :
Elaboration d'un fromage camembert**

Présenté par :

MAAMAR Hayette & ZAIDI Meriem

Soutenu le : **02 juillet 2019**

Devant le jury composé de :

Mme. MEDOUNI Sonia	Professeur	Président
Mr. BOUKHALFA Farid	MCB	Encadreur
Mme. BOUBCHIR Kahina	MAA	Examineur
Mme. BELHAMICHE Nabila	MCB	Co-encadreur

Année universitaire : 2018 / 2019

Remerciements

Avant tout nous adressons nos remerciements à ALLAH, notre Dieu qui nous a aidé et celui qui nous a donné la force, la patience et le courage pour pouvoir réaliser ce travail en disant « Dieu Merci ».

Nos remerciements s'adressent en premier lieu à notre promoteur M^r BOUKHALFA Farid, pour le sujet et le temps qu'elle nous a attribué et d'avoir accepté de diriger notre travail, pour ses précieux conseils et orientations, sans oublier sa patience.

Nos vifs remerciements s'adressent à M^{me} BELHAMICHE Nabila, pour son aide précieuse, ses conseils, ses orientations.

Nous exprimons nos respectueux remerciements à M^{me} MADOUNI Sonia d'avoir accepté de présider le jury et M^{me} BOUBCHIR Kahina d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin, on a une pensée particulière pour nos parents, nos frères et nos sœurs qui nous soutiennent dans tous nos projets et nos études.

Je dédie ce travail à

A Allah, le clément, le Miséricordieux ; nous rendons grâce à Allah le tout puissant qui nous a permis de voir ce jour solennel.

A mes parents :

Aucune dédicace ne serait exprimer mon grande amour, mon estime, ma reconnaissance et ma profonde affection, je ne saurais vous remercier tout ce que vous avez fait pour moi et ce que faites jusqu'à présent, que dieux vous garde et vous accorde longue vie.

A mes chers frères :Baderdine , Amirouche et Lounis

A mes chers sœur Ania et Anais et belles sœurs

A Mon fiancé Mouloud

A mon petit ange Ilias qui forme le charme de la vie

A Mes grands parents, mes oncles et spécialement Aziz , mes tantes, mes cousins et mes cousines

A mes tantes :Hassina , Fahima

A mes amies de promo alimentation et nutrition et spécialement à mes copines proche : Meriem, Meroa, Yasmina, Warda ,Kahina ,Lilia ,Kenza, Sara et Ryma .

A tous ce qui m'a aidé de prés ou de loin à réaliser ce travail.

Que Dieu vous protège tous « Hyette »



Ce mémoire est dédié à

Mes très chers parents que je remercie infiniment pour leur encouragement et soutien ; merci d'être ici à mes cotés, que Dieu vous garde

Mes très chers frères : Abd rahmaine et Soufiane pour qui je souhaite une immense réussite.

Mes très chères copines : Yasmina, Yasmine, Ryma, Zehira et Meroa .

A ma Binome Hayette ainsi qu'à toute sa famille.

Mes chers grandes mères :Mabrouka , Fifi

Mes chers oncles :Lyes , Smail ,Djamel, Hakim, Mbrouk ,karim,Abd ghani

mes chers cousin et cousine :Hamza ,Amel, Sidali ,Bilal

ma tante :Zahiya



Meriem

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction01

Synthèse Bibliographique

I Enzymes coagulant le lait03

I- 1 Classification des protéases03

I-2 Source des protéases.....03

I-2.1 Protéase d'origine animale03

I-2.2 Protéase d'origine microbienne.....04

I-2.3 Protéase d'origine végétale.....04

I-2 .4 Mécanisme d'action de la ficine05

II Fromage06

II-1 Caséines06

II-2 Technologie de la fabrication du fromage à pate molle type « Camembert ».....07

Partie pratique

Matériels et méthodes

I-1 Matériel végétale08

II Caracterisation physico-chimique de l'extrait brute de la ficine10

II-1 Mesure de la teneur en matière sèche10

II-2 Mesure de pH10

II-3 Teneur en protéine10

III Mesure de l'activité enzymatique11

III-1 Détermination de l'activité protéolytique	11
III-2 Evaluation de l'extrait coagulant	12
IV Détermination des conditions optimales de l'activité coagulantes	14
IV-1 Effet de température sur l'activité coagulante	14
IV-2 Effet de PH sur l'activité coagulante	14
IV-3 Effet de la concentration de CaCl ₂ sur l'activité coagulante.....	15
V Conditions optimales de l'activité protéolytiques.....	15
V-1 Effet de température sur l'activité protéolytiques.....	15
V-2 Effet de PH sur l'activité protéolytiques.....	15
V-3 Effet de la concentration de substrat sur l'activité protéolytique.....	16
V-4 Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique	16
VI Caractéristiques physico-chimiques du lait	16
VI-1 Détermination de la matière sèche.....	16
VI-2 Détermination du taux d'humidité.....	16
VI-3 Détermination d'acidité titrable	16
VI-4 Mesure de pH	17
VI-5 Dosages des sucres totaux	17
VII Processus de la fabrication de fromage à pâte molle type « Camembert ».....	17
VIII Analyse sensoriel des fromages	19

Résultats et discussion

I Caractérisation physicochimique de la ficine extraite	20
I-1 Dosages des protéines de l'extrait enzymatique	21
I-2 Mesure de l'activité protéolytique de la ficine extraite.....	21

I-3 Activité coagulante.....	22
II Déterminations des conditions optimales de l'activité enzymatique de l'extrait étudié	23
II -1 Effet de la température sur l'activité protéolytique.....	23
II-2 Effet de PH sur l'activité protéolytique.....	24
II-3 Effet de concentration de substrat sur l'activité protéolytique	25
II-4 Effet de concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique.....	26
III Effet des conditions optimales sur l'activité coagulante	27
III-1 Effet de PH sur l'activité coagulante	28
III-2 Effet de la température sur l'activité coagulante	29
III-3 Effet de concentration de $CaCl_2$ sur l'activité coagulante	30
IV Essai de fabrication du fromage type « Camembert »	31
IV-1 Analyse physico-chimique du lait	31
V Résultat d'analyse sensoriel	32
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

Arg : Arginine

Aw : Activité de l'eau

AC : Activité coagulante.

B.S.A : sérum albumine bovine.

CaCl₂: Chlorure de calcium.

C.E : commission des enzymes.

Cys : la cystéine.

CuSO₄: Le sulfate de cuivre.

CMP : Caséinomacropéptide.

Dornic (°D) : décigramme d'acide lactique par litre.

F : Force coagulante.

GM : matériau gommeux.

H (%) : Humidité.

His : l'histidine.

HCl : chlorure d'hydrogène.

ISO : Organisation internationale de normalisation.

IUBMB : internationale de biochimie et biologie moléculaire.

Lys : lysine

MS : matière sèche.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

Na₂CO₃: Carbonate de sodium.

Phe : phénylalanine

Met : méthionine

PCK : la Para-Caséine-Kappa.

pH : potentiel hydrogène.

TCA : Acide trichloracétique.

UP : Unité de présure

Liste des Figures

Figure	Titre	Pages
Figure 1	photographie de l'étape de la collecte de latex	7
Figure 2	photographie des différentes phases constituant le latex.	8
Figure 3	Représentation graphique de l'effet de la variation de la température sur l'activité protéolytique de la ficine.	22
Figure 4	Représentation graphiques de l'effet de la variation du pH sur l'activité protéolytique de la ficine	24
Figure 5	Représentation graphique de l'effet de la concentration du substrat sur l'activité protéolytique de la ficine	25
Figure 6	Représentation graphique de l'effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique de la ficine.	26
Figure 7	Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de la ficine	27
Figure 8	Effet de température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de la ficine	28
Figure9	Effet de la concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de la ficine	29
Figure10	Toile de préférence sensorielle entre le camembert issue de la coagulation par la ficine et par la présure (témoin industriel)	31

Tableau	Titre	Page
I	Caractéristiques physico-chimiques et activité enzymatique de l'extrait enzymatique de la ficine extraite.	19
II	Résultats physicochimique des laits utilisés pour la fabrication du fromage	30

Le lait est un produit noble, et vital pour les premiers mois de vie des mammifères. Il possède une grande valeur nutritionnelle, attribué à la richesse de sa composition. Cependant le lait est facilement altérable, ce qui constitue un facteur limitant de son utilisation et sa conservation. De cela, sa conservation était primordiale, d'où les premières transformations laitières en fromage sont apparues (Jeantet, Croguennec et al. 2017) .

La fabrication du fromage est apparue il y a 8000 ans, peu après la domestication des animaux. A l'origine, l'intérêt majeur de la transformation du lait en fromage était de conserver les principaux constituants du lait. Aujourd'hui, il s'agit plutôt d'un aliment, possédant des qualités nutritionnelles indéniables (Jeantet, Croguennec et al. 2017) .

La coagulation du lait est l'étape clé de la réussite des préparations fromagères, il apporte des modifications physico-chimiques intervenant sur les micelles de caséines, d'où la formation d'un gel qui diffère selon la nature de l'agent coagulant et le type de fromage (Muehlhoff, Bennett et al. 2013).

La présure, cette protéase très utilisée pour la coagulation du lait au cours de la fabrication de fromage était toujours recherchée. Sa pénurie s'est manifestée à l'échelle mondiale; causé d'une part par la réduction de l'abattage des veaux qu'est un fardeau pour le marché de viande, par conséquent un manque de la matière première (la caillette des jeunes veaux), ce qui a conduit à une élévation du prix de la présure. Et d'autre part l'accroissement de l'industrie fromagère qui ne cesse pas de s'augmenter (Hamer Laine et Zoubiri 2018).

Selon l'office national des statistiques (2012), la production de l'industrie fromagère en Algérie est passée de 20 milles tonnes en 2006 à 30 milles tonnes en 2011, avec une consommation moyenne de 0,6 Kg/habitant/an en 2006 à 0,7 Kg/habitant/an en 2011. D'où, l'importation totale de la présure traditionnelle ou de ses succédanés d'origine microbienne en Algérie est d'environ 1,5 tonne par an. Cette quantité coûte approximativement 102 000 \$, somme équivalente à 7,5 millions de DA

Pour cela, la recherche et l'étude des succédanés susceptibles de remplacer la présure en fromagerie, ont été fortement stimulées.

Pour le choix des succédanés de la présure, il faut tenir compte non seulement de l'activité coagulante, mais aussi de son activité protéolytique non spécifique, dans les conditions de pH et de température qui se présentent en fromagerie (Alais (1984), et également doivent aussi répondre à trois critères principaux, à savoir, l'absence de la toxicité ;

l'obtention d'un produit fromagère comparable à ceux de la présure animale et un prix de revient moins élevé à celui de la présure.

Les protéases d'origine végétale sont les succédanés, les plus anciens employés dans des préparations traditionnelles telles que celles provenant du papaya, de l'artichaut, du chardon (*Cynara cardunculus*), ou du latex du figuier (*Ficus carica*).

La Ficine, est le nom donné pour l'enzyme protéolytique isolée à partir de latex des arbres du genre *Ficus*. Elle appartient à la famille des protéases à cystéine [Azarkan, Matagne et al. \(2011\)](#). Très anciennement utilisés (périodes antiques) pour la fabrication des fromages [Feijoo-Siota and Villa \(2011\)](#) et pour l'attendrissement de la viande ([Grzonka, Kasprzykowski et al. 2007](#)).

Le latex du figuier *Ficus carica* est très utilisé dans les régions d'Algérie, particulièrement la Kabylie, comme agent coagulant pour la préparation d'un fromage connu sous le nom *AGUGLI*.

Dans le but, d'encourager et de vulgariser cette pratique ancestrale, s'inscrit l'objectif de cette étude qui est la caractérisation de l'extrait brut de latex "la ficine", ainsi que l'étude de la possibilité de son emploi comme succédanés de présure dans l'industrie fromagère pour fabrication d'un fromage à pâte molle « le camembert ».

Afin d'atteindre l'objectif tracé, ce travail est divisé en deux parties. La première est une étude bibliographique et la seconde est une partie pratique divisée en deux sections, à savoir matériel et méthodes et discussion des résultats.

Au cours de la partie bibliographie, un aspect général sur les protéases, la ficine et son mode d'action, et également sur la technologie des fromages à pâte molle, dont le camembert, est détaillé.

Au cours de la partie pratique, la collecte des matières premières (latex de figuier), extraction et caractérisations de l'extrait brut de la ficine ainsi que la recherche des conditions optimales de son activité coagulant, essai de production d'un fromage, caractérisation sensorielle de camembert obtenu ainsi que la présentation des différents résultats obtenus et leur discussion, été détaillé.

L'étude est finalisée par une conclusion générale et des perspectives pour compléter la présente étude.

I. Enzymes coagulant le lait

Les enzymes coagulant le lait sont de la classe des protéases, capables d'hydrolyser les caséines (protéines majoritaires du lait), par coupure d'une ou de plusieurs liaisons peptidiques. Elles sont dénommées peptidase par l'union internationale de biochimie et biologie moléculaire (IUBMB), mais elles portent d'autres noms, comme protéinases ou enzymes protéolytiques.

I-1 Classification des protéases

Les protéases appartiennent à des hydrolases. Et peuvent être classées elles-mêmes en protéases acides, neutres et alcalines, selon la gamme du pH dans laquelle leur activité est optimale [Kumar, Sharma et al. \(2005\)](#) ou en exopeptidases et endopeptidases, selon leur mode d'action; les premières hydrolysent les liaisons peptidiques à partir des extrémités, les secondes agissent en divers points de la séquence [Palma, Sandalio et al. 2002](#).

Les protéases peuvent être classées également selon les acides aminés du site actif, ce qui permet de les regrouper en protéases à sérine, les protéases à cystéine etc.

I-2 Sources des protéases

La vaste distribution des protéases chez les plantes, les animaux, et les microorganismes démontre que ces enzymes sont nécessaires à la survie des organismes. Elles jouent des rôles physiologiques importants dans les différents processus biologiques [Rao, Tanksale et al. \(1998\)](#). On distingue selon leur origine :

I-2.1 Protéases d'origine animale

Les protéases d'origine animale sont utilisées dans le domaine alimentaire comme la présure ou dans le domaine médical tel que la trypsine et la chymotrypsine. Ces dernières sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs [\(Rao, Tanksale et al. 1998\)](#).

➤ **Présure** : est un coagulant du lait d'origine animale extrait de la caillette de veaux non sevrés. La préparation est constituée de 80% de chymosine et de 20% de pepsine. Elle est employée pour la coagulation du lait dans la fabrication des fromages [\(Collin 2015\)](#).

➤ **Chymosine** : est la protéase majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale du lait. Elle est sécrétée inactive sous forme de prochymosine dans la caillette. Sous l'action de l'acidité (ions H_3O^+) du milieu, elle devient active. C'est une holoprotéine, appartenant au groupe des protéases acides. Elle est stable aux pH (5.3 à 6.3), inactivée aux pH (vers 7.5) et dénaturée à pH 8. L'inactivation thermique à lieu 50°C, elle est totalement inactivée à 61°C [\(Bouyoucef, Taouzin et al. 2016\)](#).

- **Pepsine** : est extraite de l'estomac des mammifères adultes ou du proventricule de volailles. Elle hydrolyse la plupart des protéines naturelles telles que la caséine, Elle attaque préférentiellement les peptides contenant de la L-Phénylalanine ou de la L-Tyrosine et plus généralement les acides aminés à noyau aromatique (Boughellout 2007).
- **Trypsine** :est une protéase digestive à sérine, l'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du goût très amer qu'elle entraîne Rao, Tanksale et al. (1998)est utilisée aussi dans la préparation de milieux bactériens et dans certaines applications médicales spécialisées (Rao, Tanksale et al. 1998)
- **Chymotrypsine** : La chymotrypsine pure est une enzyme coûteuse est trouvée chez des animaux extrait pancréatique. et utilisé uniquement pour des applications diagnostiques et analytiques. Il est spécifique de l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans laquelle les groupes carboxyle sont fournis par l'un des trois groupes amino-aromatiques.(Phénylalanine, la tyrosine ou le tryptophane) (Rao, Tanksale et al. 1998).

I-2.2 Protéases d'origine microbienne

Les protéases microbiennes peuvent être produites par les bactéries, les moisissures et les levures. Dès que le développement de la microbiologie a permis de mieux comprendre les systèmes qui président à la synthèse des enzymes chez les microorganismes, la production industrielle d'enzymes s'est orientée vers les processus fermentaires ; les protéases d'origine microbiennes représentent 40% des enzymes du marché mondial (Rao, Tanksale et al. 1998).

I-2.3 Protéases d'origine végétale

Les protéases végétales les plus connues sont extraites du papayer appelée la papaine (*Carica papaya*), et du figuier(*Ficus carica*) appelée la ficaine ou la ficine. Elles sont appliquées essentiellement dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

➤ **Ficine**

La ficine, une enzymes extraite du latex du figuier, dont le nom botanique *Ficus carica* L., un arbre à feuilles caduques de la famille des Moraceae qui comprend environ 1500 espèces classées en 52 genres dont le genre ficus (Solomon, Golubowicz et al. 2006; Nicotra, Vicentini et al. 2010; Mawa, Husain et al. 2013).

Le figuier originaire du Moyen Orient et naturalisé dans plusieurs régions du bassin méditerranéen, dont il fournit l'essentiel de la production mondiale (Abdelkader 2017), dont la wilaya de Bejaia occupé le sommet de la production nationale (Annexe VII).

La ficine est une cystéylprotéase extraite de la figue, elle est semblable à la papaïne et constitué de deux acides aminés qui sont la cystéine (Cys-25) et l'histidine (His-159). Katsaros, Katapodis et al. (2009) Cette protéase végétale est isolée à partir du latex de *Ficus carica*, et utilisée dans l'industrie alimentaire pour améliorer l'attendrissement des viandes Sullivan et Calkins (2010) et la fabrication de fromages traditionnels.

La ficine est une endopeptidase activée par les thiols et les réducteurs (cystéine, thiosulfate, glutathion), elle est inactivée par les ions métalliques, les oxydants et les réactifs qui réagissent avec les thiols. La ficine présente une grande stabilité thermique. Sa température d'activité est comprise entre 30°C à 65° C., elle est active à des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 8 avec une activité optimale à pH 6,5 l'inactivation complète de la ficine se produit en dessous de pH 3 (Devaraj, Kumar et al. 2008; Azarkan, Matagne et al. 2011).

Selon Öner et Akar (1993), la ficine peut remplacer avec succès la chymosine dans la fabrication de fromage. Traditionnellement, dans les montagnes d'Algérie, particulièrement la Kabylie, le latex de figuier est utilisé comme agent coagulant pour la préparation d'un fromage connu sous le nom AGUGLI ou IGUISSI selon la région.

II. Mécanisme d'action de la Ficine

La ficine a une large spécificité d'hydrolyse des liaisons contenant des acides aminés non chargés, aromatiques et/ou hydrophobes, le mécanisme d'action de la ficine est similaire à celui de la chymosine, la phase primaire ou enzymatique correspond à une attaque de l'enzyme sur la composante qui stabilise la micelle, c'est-à-dire que l'enzyme hydrolyse la caséine- κ au niveau de la liaison Phe105-Met106, la chaîne peptidique se trouve ainsi coupée en deux segments inégaux : le segment 1-105 est la Para-Caséine-Kappa ou PCK et le segment 106-169, le Caséinomacropéptide ou CMP. La PCK liée aux caséines α et β reste intégrée à la micelle hydrophobe et le CMP contenant tous les glucides est libéré et passe dans le lactosérum. Lors de la libération du CMP, il se produit une diminution

importante de la charge électrique des micelles et de leur degré d'hydratation : deux facteurs de stabilité se trouvent ainsi atteints.

La phase secondaire dite agglomération, les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes. Les ions calcium s'uniraient à la partie chargée négativement des micelles, diminuant ainsi les répulsions électrostatiques auxquelles elles sont soumises et favoriseraient ainsi leur agrégation (Lapointe-Vignola 2002) .

III. fromage:

C'est un produit laitier fermenté, d'une grande stabilité et sécurité, une transformation offrant une longue durée de vie au lait (Hamer Laine et Zoubiri 2018).

Le fromage peut être comme un produit affiné ou non, molle, semi-dur, dur ou extra-dur, qui peut être enrobé, et dans lequel le rapport protéines de lactosérum / caséine ne dépasse pas celle du lait, obtenue par:

a) la coagulation totale ou partielle de la protéine du lait par l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés.

b) les techniques de traitement impliquant la coagulation de la protéine du lait et / ou les produits obtenus à partir de lait qui donnent un produit final ayant des propriétés physiques, des caractéristiques chimiques et organoleptiques du produit obtenu par la coagulation (Muehlhoff, Bennett et al. 2013).

III.1 Les caséines

Les caséines représentent 80% des protéines totales du lait et se définissent généralement comme la fraction protéique qui précipite suivant une acidification du lait à pH 4.6, à une température de 20°C Singh et Bennett (2002).les composantes majeures de la fraction caséique sont les caséines α_1 , α_2 , β , et la caséine- κ . Il existe également une caséine γ qui est formée par l'hydrolyse de la caséine β par le plasmide.Les micelles de caséines sont constituées de 92% de protéines et de 8% de minéraux Lapointe-Vignola (2002) . Les caséines sont des phosphoprotéines, dont les propriétés diffèrent considérablement de la plupart des autres protéines Holt, De Kruif et al. (2003). Elles sont hydrophobes et ont une charge relativement élevée et contiennent beaucoup de la proline et peu de résidus de cystéine (Huppertz, Upadhyay et al. 2006).

III. 2 Technologie des fromages a pâte molle « camembert »

Ce type de fromage «camembert» se divise en trois catégories définis par l'aspect de la croûte et par le procédé de salage: les pâtes molles à croûte fleurie, les pâtes molles à croute lavée et les fromages à croûte persillée. Ils sont fabriqués à partir de lait pasteurisé ou de lait cru de chèvre, de vache ou de brebis (Bouacherine et Ouchene2017).

I. Matériel et méthodes

I-1 Matériel végétal

Dans le but de caractériser l'extrait brut coagulant du figuier *Ficus carica* L., la matière première végétale utilisée est le latex, le liquide blanc visqueux qui s'échappe des feuilles, des jeunes tiges et des fruits immatures une fois séparés.

La collecte du latex a été effectuée durant la période qui s'étale de la fin de mois de juin jusqu'au mois de septembre dans la région de Sidi Aiche (Bejaia), par incision manuelle de pédoncule du fruit vert et des jeunes tiges de la branche principale.



Figure 1 : photographie de l'étape de la collecte de latex

Le latex est récupéré dans des flacons de 15ml propres, dont le volume total de latex récupéré pour cette étude est d'environ 80mL. Ainsi frais, il a été transporté au laboratoire dans une glacière et immédiatement repartis dans des tubes.

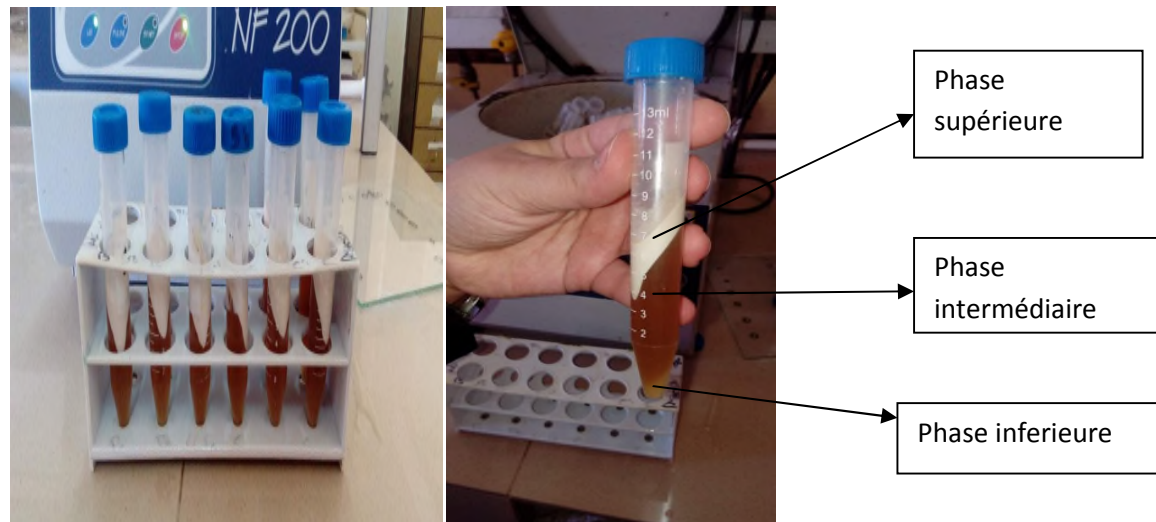
Après centrifugation à 5000tr /min pendant 20 minutes à 4°C, trois phases sont récupérées.

Une phase supérieure de consistance molle et de couleur blanche opaque. ce sont les gommes représentant environ 10 à 15 % du volume total.

Une phase inférieure : constituée de déchets se trouve sur l'écorce de l'arbre se mélangeant à la sève au cours de l'écoulement, et qui représentent moins de 1% de volume total.

Une **phase intermédiaire** liquide de couleur marron, qui représente la majeure partie, c'est la solution contenant l'enzyme. (Gagaoua, Boucherba et al. 2014)

L'extrait enzymatique brut de la ficine, est conservé dans des eppendorfs de 2ml, au congélateur à (-80°C) jusqu'à l'utilisation.



On récupère chaque phase seul

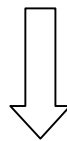


Figure 2 : photographie des différentes phases constituant le latex.

II. Caractérisation physico-chimique de l'extrait brut de la ficine

II-1 Mesure de la teneur en matière sèche

Le taux de matière sèche dans l'extrait enzymatique étudié a été déterminé selon la méthode décrite dans la norme AFNOR NF VO4-207 (Bouacherine et Ouchene 2017).

Un échantillon de 1 ml de l'extrait enzymatique est placé dans une capsule en verre préalablement taré. Il est ensuite mis à l'étuve à $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'obtention d'une masse constante puis, il est refroidi dans un dessiccateur. Le pourcentage en matière sèche est déterminé par la relation suivante:

$$\text{MS (\%)} = P \times 100 / P_i$$

P_i : poids initial en gramme, de la prise d'essai ;

P : poids en gramme, de la prise d'essai séchée après passage dans l'étuve à $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A partir le taux de matières sèches, le taux d'humidité (H %) a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{H (\%)} = 100 - \text{MS (\%)}$$

II-2 Mesure du pH

Le potentiel hydrogène (pH) a été déterminé selon la méthode de AFNOR (1981), directement en utilisant un pH-mètre électronique, qui affiche la valeur sur son écran après avoir plongé son électrode dans un bécher contenant la ficine, dont la mesure est réalisée en cinq répétitions.

II-3 Teneur en protéine

Le dosage des protéines totales d'extrait enzymatique a été déterminé selon la méthode de Bradford (1976)

La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique dont le principe repose sur l'absorption du bleu de Coomassie G-250 sur les protéines (avec les acides aminés basiques tel que : Arg, Lys, His).

Une fois lié aux protéines sa couleur vire vers le bleu avec une absorbance maximale aux alentours de 595 nm, dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon.

Pour 125 µl de l'extrait enzymatique de ficine dilué avec 375 µl de l'eau distillée, 2 mL de réactif de Bradford sont ajoutés. Une fois bien homogénéisé avec un vortex, l'ensemble est gardé à l'obscurité et à température ambiante pendant 20 minutes, et l'absorbance est alors mesurée au spectrophotomètre à 595 nm.

La concentration en protéines, des extraits enzymatiques, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage avec la protéine du sérum albumine bovine (SAB) réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons ([Annexe III](#)).

III. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de l'extrait brut de la ficine, a été estimée par deux méthodes, à savoir la mesure de l'activité protéolytique et l'évaluation de l'activité coagulante.

III-1 Détermination de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode décrite par [Green et Stackpole \(1975\)](#), basée sur l'estimation de la quantité des peptides simples et des acides aminés libres formés par l'hydrolyse d'une protéine substrat sous l'action d'une protéase ou un mélange de protéases.

En effet, l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique a été déterminée en employant la caséine comme substrat. Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par une protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés.

L'activité protéolytique est mise en évidence par un dosage colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de [Lowry, Rosebrough et al. \(1951\)](#), en utilisant la caséine comme substrat dans les conditions adaptées ([Mechakra, Auberger et al. 1999](#)).

L'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard.

Le mélange réactionnel consiste à mélanger 1 g de caséine dans 50 mL de tampon phosphate (0.1 M, pH 7).

Un volume de 1 mL de ce mélange est additionné de 1 mL d'extrait enzymatique, qui sera ensuite bien agité et incubé au bain marie à la température de 37°C pendant 20 minutes, et la

réaction est arrêtée par l'addition de 5 mL de TCA à 5% et laissé au repos pendant 15 minutes à température ambiante.

L'ensemble est alors centrifugé, et 0.5 mL de surnageant est additionné de 2,5 mL de la solution C préparée en mélangeant un volume de 100 mL de la solution A avec un volume de 2 mL de la solution B.

La solution A est préparée en mélangeant 1g d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 5 g de carbonate de sodium (Na_2CO_3) dans 250 mL d'eau distillée.

La solution B est préparée en mélangeant 0.1 g de tartrate sodium-potassium ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$) et 0.032g de sulfate de cuivre CuSO_4 dans 10 mL d'eau distillée.

Après une incubation pendant 10 minutes à 35 °C, un volume de 250 μL de réactif de *Folin-Ciocalteu* (dilué au 1/2) est ajouté.

Une fois bien agité et incubé à température de 35°C pendant 20 min, une coloration bleue apparaît, et l'absorbance est alors mesurée à 660 nm.

La concentration en tyrosine des tubes, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la tyrosine dans les mêmes conditions expérimentales ([Annexe IV](#)).

L'activité protéolytique, exprimée en $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$, correspond à la libération de 1 μg de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par minute et dans 1mL de substrat.

A partir de l'activité protéolytique, une activité spécifique, exprimée en $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{min}$, est calculée. Elle est définie comme étant le rapport entre l'activité enzymatique et la teneur en protéines de l'extrait enzymatique.

Activité spécifique = activité enzymatique ($\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{min}$) / teneur en protéines (mg/ml).

III-2 Evaluation de l'activité coagulante

L'activité coagulante qui exprime par la rapidité avec laquelle l'enzyme coagule le lait, est déterminée selon la méthode de Berridge (1955) ([Libouga, Vercaigne-Marko et al. 2006](#)).

Elle est basée sur l'évaluation visuelle de l'apparition des premiers flocons de la coagulation du substrat de Berridge.

Cette activité est exprimée en unité d'activité coagulante (U.A.C) ou d'unité présure (UP) qui est définie par la quantité d'enzyme contenue dans 1mL de la solution enzymatique qui peut coaguler 10 mL de substrat standard de Berridge en 100 secondes à 35°C (Benyahia-Krid, Attia et al. 2010)

Le substrat de Berridge est préparé par l'addition de 12 mg de lait écrémé à 100ml de solution de CaCl₂ (0.01M). Après 15 minutes d'agitation lente, le pH est ajusté à 6.4.

Afin de mesure l'activité coagulante à 35°C, ce substrat est chauffé au bain marie jusqu'à la température voulue, dont un volume de 5ml de ce substrat (35°C) sont additionné de 500µL l'extrait enzymatique.

La mesure du temps de coagulation correspond au temps s'écoulant entre l'addition de l'extrait enzymatique au de substrat de Berridge, et de l'apparition des premiers flocons caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne de tube incliné, subissant un lent mouvement rotationnel. L'activité coagulante, exprimée en Unité Présure (UP), est calculée selon l'expression suivante :

$$\text{U.A.C (UP)} = \frac{100 * V}{10 * t * v}$$

Avec :

UP = unité présure ; **V** = volume de lait (substrat de Berridge) ;

10 = volume du substrat standard (10 mL) ; **100** = temps de coagulation du substrat standard

v = volume de l'extrait d'enzyme; **t** = temps de floculation en secondes.

L'activité coagulante peut être également exprimée par la force coagulante (F), représente le nombre de volumes de lait frais coagulé par un volume d'extrait coagulant, pendant un temps de 15 min à 35°C (BOUACHERINE et OUCHENE 2017).

La force coagulante (F) est calculée selon la formule suivante :

$$F = \frac{900 * V}{T * v}$$

Avec :

V: volume de lait ;

v : volume de l'extrait de l'enzyme ;

T : temps de coagulation en secondes ;

900 : temps d'incubation (15min) x 60 secondes.

IV. Détermination des conditions optimales d'activité coagulante

IV-1 Effet de la température sur l'activité coagulante.

L'influence de la température sur l'activité coagulante a été étudiée en mesurant l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de la ficine, à différentes températures (30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 ; 55 ; 60 ; 65°C), et en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique, préparé dans les mêmes conditions, à savoir la concentration en CaCl_2 (0.01M), et le même pH = 6.4.

Le choix de ces températures est justifié par le fait que la coagulation du lait en fromagerie s'effectue à des températures supérieures à 30°C, mais à partir de 70°C l'extrait enzymatique risque d'être inactivé (Ramet 1985).

L'activité coagulante a été mesurée pour chaque valeur de température, exprimée en moyenne de cinq essais répétés, dont les essais sont réalisés dans les mêmes conditions de pH et de concentration en CaCl_2 .

IV-2 Effet du pH sur l'activité coagulante

L'influence du potentiel hydrogène (pH) du lait sur l'activité coagulante a été étudiée en mesurant l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de la ficine à température optimale, mais à différents pH, Le pH du lait a été ajusté pour les valeurs de 5,5 ; 6,0 ; 6,5 ; 7,0 ; 7,5, par l'addition des solutions de HCl (0,1N) ou de NaOH (0,1N).

La température du lait est ramenée à (65°C) afin de mesurer le temps de coagulation qui correspond au temps s'écoulant entre l'addition de 0.5ml l'extrait enzymatique à 5ml du substrat de Berridge et l'apparition des premiers flocons caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne du tube incliné subissant un lent mouvement de rotation.

Le choix de cet intervalle de pH est basé sur le fait qu'à des valeurs de pH inférieur à 5 la coagulation peut devenir une coagulation acide. L'augmentation du pH à des valeurs supérieures à 7 peut provoquer l'inactivation de la protéase employée (Huppertz, Upadhyay et al. 2006).

IV-3 Effet de la concentration de CaCl₂ sur l'activité coagulante

L'influence de la concentration en CaCl₂ du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de la ficine a été étudiée à des conditions optimales (température = 65°C et à pH=5.5), en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique, préparé avec différentes concentrations en CaCl₂ :0.005M ; 0.01M ; 0.02M ; 0.03M ; 0.04M et 0.05M.

Et le temps de floculation est mesuré pour chaque concentration, et correspond au temps s'écoulant entre l'addition de l'extrait enzymatique au substrat de Berridge, à la concentration en CaCl₂ donnée, et de l'apparition des premiers flocons caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne de tube incliné, subissant un lent mouvement rotationnel.

V. Les conditions optimales d'activité protéolytique

V-1 Effet de la température sur l'activité protéolytique

L'effet de la température sur l'activité protéolytique de l'extrait de ficine étudié, a été déterminé selon le protocole de [Green et Stackpoole \(1975\)](#), en mesurant cette activité à des variations de températures (40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°, 65°C), en utilisant la caséine bovine comme substrat de la réaction enzymatique, préparé à pH = 7.

V-2 Effet du pH sur l'activité protéolytique

L'influence du pH sur l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique de la ficine, est déterminée selon le protocole de [Green et Stackpoole \(1975\)](#), en mesurant cette activité à température optimale à 60°C, et à des variations du pH (6 ; 6.5 ; 7 ; 7.5), en utilisant la caséine bovine comme substrat de la réaction enzymatique.

V-3 Effet de la concentration du substrat (caséine) sur l'activité enzymatique de la ficine

L'effet de la concentration de la caséine sur l'activité enzymatique de la ficine est étudié, en mesurant l'activité protéolytique à cinq concentrations différentes de la caséine du lait, qui est toujours le substrat de la réaction enzymatique.

L'influence de la concentration du substrat (caséine) sur l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique de la ficine, est déterminée selon le protocole de [Green et Stackpoole \(1975\)](#), en variant la concentration du substrat (caséine) de 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 mg/ml.

V-4 Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité enzymatique de la ficine

L'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique de la ficine, est déterminée selon le protocole de [Green et Stackpoole \(1975\)](#), en variant la concentration du volume enzymatique de 10 à 60mg/ml.

VI. Caractéristique physicochimique du lait

VI-1 Détermination de la matière sèche

L'extrait sec total représente la teneur en matière sèche totale, c'est-à-dire la différence entre le poids de l'aliment et sa teneur en eau.

La matière sèche est déterminée sur un échantillon de 10 ml de lait ou 1g de lait en poudre par dessiccation à l'étuve à une température de $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; jusqu'à l'obtention d'un poids constant [Benaouida \(2008\)](#). Après, refroidissement au dessiccateur, le pourcentage en matière sèche est déterminé par la relation :

$$\text{MS (\%)} = \text{P} \times 100 / \text{P}_i$$

P_i : poids initial en gramme, de la prise d'essai ;

P : poids en gramme, de la prise d'essai séchée après passage dans l'étuve à $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

VI-2 Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité (H) du lait et de la poudre du lait est déterminé, par étuvage à $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$, selon le protocole décrit par **ISO (1998)**. Le taux d'humidité (H %) est alors calculé, selon la formule suivante :

$$\text{H(\%)} = 100 - \text{MS (\%)}$$

VI-3 Détermination de l'acidité (Dornic)

L'acidité de la poudre de lait est déterminée par titrimétrie [Aggad, Mahouz et al. \(2009\)](#), par la soude (0,1N) jusqu'à pH 8,4, d'un volume de solution de poudre de lait dissoute dans l'eau distillée. L'acidité titrable de la poudre de lait, est donnée par l'expression :

$$\text{Acidité (degré Dornic)} = 2 * V$$

Avec :

V : est le volume de solution d'hydroxyde de sodium utilisé pour le titrage.

ou 1°D représente 0,1 g d'acide lactique par litre de lait (AFNOR 1993) .

VI-4 Mesure du potentiel d'hydrogène (pH)

Le principe consiste à la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence réunies en un système d'électrodes combiné.

Le pH est déterminé directement en utilisant un pH-mètre électronique et ce après avoir plongé l'électrode dans un bêcher contenant une solution de poudre de lait à analyser (solution à 10% de poudre de lait dans de l'eau déminéralisée). La valeur du pH est lue directement sur l'écran de l'appareil.

VI-5 Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de Dubois, Gilles et al. (1956). Une prise d'essai de 2g de du lait est mélangée avec 50ml de méthanol 80% et laissée sous une agitation pendant 5 min, à température ambiante.

Un volume de 3ml de sels CAREZ I et CAREZ II est additionné au mélange, suivi d'une filtration .Pour un volume de 1 ml du filtrat sont ajoutés respectivement, 1 ml de phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique H_2SO_4 (1N), le mélange est mis à l'abri de la lumière pendant une heure à une température ambiante. L'absorbance est mesuré à 485nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc.

La teneur en sucre totaux est exprimée en g équivalent de glucose /100g du lait, en se référant à une courbe d'étalonnage (Annexe V).

VII. Le processus de la fabrication d'un fromage à pâte molle type « Camembert »

Pour le lait en poudre, est reconstitué en mélangeant 130 g du lait en poudre dans un litre du l'eau minéralisé. Ce dernier, une fois bien homogénéisé, est mélangé avec un litre de lait de la vache crue.

Le lait, une fois mélangé, est chauffé à 85°C, pour le pasteuriser et réduire au maximum la charge microbienne, et également pour éviter l'incorporation élevée des protéines sériques. Ce

lait est ensuite refroidi à 65°C, pour êtreensemencé avec l'extrait enzymatique de ficine (250µl pour 2 L du lait cru), et permettre la coagulation après un temps de coagulation d'environ 7 min.

Des ferments d'affinage (80% de la flore mésophiles et 20% de la flore thermophiles) sont ensuite ajoutés au laitensemencé, dans le but de participer, d'une part, à la coagulation du lait (en provoquant l'acidification), et d'autre part, à l'affinage du fromage (rôle dans l'activité protéolytique).

Après la coagulation complète du lait, le caillé ainsi obtenu est tranché verticalement et horizontalement par des couteaux, afin de former des cubes de 1 cm³ environ, en s'assurant à chaque fois de la libération des surfaces périphériques des récipients et cela pour activer la synérèse (diffusion de lactosérum). Cette opération est suivie d'un repos de 10 à 15 min.

Le caillé est bien égoutté en utilisant un tissu en toile polystyrène. Des quantités de sel de CaCl₂ (5%) sont ajoutées afin de compléter l'égouttage.

Ensuite, le caillé égoutté est mis dans des moules en métallique sous forme ronde, pour permettre l'égouttage ou la diffusion du lactosérum, et donner la forme du fromage.

La phase la plus longue, commence au début de moulage et se termine le lendemain matin au démoulage, pendant cette opération trois retournements sont au moins réalisés, pour bien séparer le lactosérum du caillé, durant laquelle, on distingue deux actions complémentaires :

- Expulsion de sérum par le coagulum qui se contracte et se concentre (synérèse).
- Séparation du sérum et du caillée par action physique.

Après 24 heures, le fromage est retiré des moules (démoulage), le fromage subit un salage par pulvérisation de la saumure (sel de table 320 g NaCl/1 L d'eau) saturé chaque heure pendant 5heures.

Le salage a un triple rôle :

- ❖ Il complète l'égouttage et contribue à la formation de la croûte ;
- ❖ Il règle l'activité de l'eau (A_w) du fromage et par là, freine ou oriente le développement des micro-organismes et les activités enzymatiques au cours de l'affinage ;
- ❖ Il relève la saveur du fromage et masque le goût de certaines substances formées au cours de l'affinage

L'affinage est réalisé dans des boites en plastique déposés dans le réfrigérateur du laboratoire technologie alimentaire, dans le but de favoriser les conditions de l'affinage, la

température doit être entre 10 à 12°C, avec 85-95% d'humidité relative. La période d'affinage est, environ 28 jours.

Au 5^{ème}, 10^{ème} et au 15^{ème} jour, les fromages subissent des retournements afin d'assurer une poussé homogène du *pénicillium sp*(fines moisissures blanches) sur toute la surface du camembert et pour permettre l'obtention d'une croûte homogène.

Après cette opération, et à partir de 20^{ème} jour, des observations quotidiennes sont procédées dans le but de suivre l'état de l'affinage, ainsi des tests de touches et de sensations sont effectués.

Au 29^{ème} jour d'affinage, les camemberts obtenus, sont comparés à des camemberts industriels (témoin).

VIII. Analyse sensorielle des fromages

La réalisation de l'analyse sensorielle a pour but de comparer entre les deux fromages, dont le premier issu de la coagulation par la ficine et le second un camembert industriel (témoin) issu de la coagulation par la présure, et également d'estimer le degré d'acceptabilité du nouveau produit par les dégustateurs.

L'évaluation sensorielle des produits expérimentaux est réalisée dans une salle spéciale au niveau du laboratoire animalerie, de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, et ceci en utilisant un jury de dégustateurs, au nombre de 60, dont la majorité de tranche d'âge de 20 à 35 ans.

Une présentation de deux types de fromage de portion de (15g) est exposée de façon anonyme aux dégustateurs, dans un ordre spécifique de gauche à droite. Un questionnaire ([AnnexeVIII](#)) portant des critères bien établis est alors présenté. Les résultats obtenus, sont traités et comparés afin de déterminer les points en commun et les points de divergence entre les deux fromages, et ceci par un logiciel Excel stat 2013.

I. Caractérisation physico-chimique de la ficine extraite

L'extraction de la ficine brute à partir du latex de *Ficus carica* L. est effectuée par centrifugation (5000 tr/min pendant 20 min) et trois couches ont été récupérées, dont la couche intermédiaire représente l'extrait enzymatique de la ficine. Les caractéristiques de l'extrait enzymatique de la ficine obtenu sont présentées dans le tableau I

Tableau I : Caractéristiques physico-chimiques et activité enzymatique de l'extrait enzymatique de la ficine extraite.

Caractéristiques	Moyenne
pH	5,13±0,01
Couleur	Marron foncé
Texture	Visqueuse
Matière Sèche (%)	20±0,01
Rendement (%)	74
Teneur en protéines (mg/ml)	66,24±1,53
Activité protéolytique (µg/ml/min)	358
Activité enzymatique spécifique (µg/mg.min)	324
Activité coagulante UP	253,01
Force coagulante	22771

L'extrait de la ficine obtenu est une solution acide (pH=5,13), de couleur marron foncé avec un aspect visqueux, avec une odeur fruitière prononcée. Sa disponibilité est faible à cause de mode d'obtention qui reste primitif par incision du figuier et récupération manuelle du latex. Ces caractéristiques sont confirmées par les résultats de (Nouani, Dako et al. 2009). L'extrait obtenu contient 20% en matière sèche. Le rendement de récupération du système enzymatique, à l'état brut, à partir du latex de figuier est de 74% (59,2mL de ficine pour 80mL de latex). Ce résultat est proche à celui obtenu par (Siar), qui l'ont estimé à 71,42%.

Cette différence peut être expliquée par les différences climatiques entre les régions de collection du latex, ainsi que les caractéristiques du sol qui peuvent influencer sur la composition du latex (Lazzouni).

I.2 Dosage des protéines de l'extrait enzymatique

Selon la méthode de Bradford, en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec la BSA dans les mêmes conditions expérimentales, la concentration des protéines de la ficine de *Ficus carica* L. est estimée à $66,24 \pm 1,53$ mg/mL. Cette teneur en protéine est la plus proche parmi les résultats, (Siar) qui a retrouvé en moyenne de $89,31 \pm 0,96$ mg/ml.

Selon les travaux de (Nouani, Dako et al. 2009) la teneur en protéine de l'extrait brute de la ficine de *Ficus carica* est 22 mg/ml, tandis que (Fadyloğlu 2001) ont retrouvés des taux compris entre 116 à 156mg/ml.

(Devaraj, Kumar et al. 2008), en étudiant le latex de *Ficus racemosa* ont retrouvés une teneur en protéine de l'ordre de 156mg/ml.

Cette différence de la teneur en protéine est possible due a plusieurs facteurs entre autres le facteur variétal, la conduite agronomique, le climat et la saison.(Abdelkader)

I-3 Mesure de l'activité protéolytique de la ficine

Toutes les enzymes coagulantes qu'elles soient d'origine animale, végétale ou microbienne, sont capables d'hydrolyser la caséine κ , provoquant ainsi la coagulation du lait. Toutefois cette condition est suffisante pour l'utilisation de ces enzymes en industrie fromagère (Alais 1984), mais pour la production des fromages de qualité, il faut tenir compte de leur grande activité protéolytique non spécifique supplémentaire qui leur donne le pouvoir d'hydrolyser les caséines α et β (Lapointe-Vignola 2002) .

D'après les résultats obtenus (Tableau I), l'activité protéolytique, exprimée par le taux de tyrosine libéré, de l'extrait brut de la ficine, est de $358.5 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$. Ce résultat indique que de l'extrait de ficine possède une activité enzymatique très élevée par rapport au extrait de présure et de pepsine (BOUACHERINE and OUCHENE 2017).

De même, (Fox 2003) et (Walstra 1999) ont signalé que la ficine manifeste une activité protéolytique excessive due à son action non spécifique envers les autres caséines (α et β)

Plusieurs auteurs ont étudiés l'activité protéolytique de la ficine (Lynn and Clevette-Radford 1986) ; (Öner and Akar 1993);(Nouani, Dako et al. 2009); (Faccia, Picariello et al. 2012) ; (Shah, Mir et al. 2014),(Siar) et (Fadyloğlu 2001) particulièrement ces deux dernier on rapporter des teneur on activité protéolytique de l'extrait de ficine est de $469,7 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$, et de $320 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$ respectivement .

Les résultats obtenus (Tableau I) montrent que l'activité protéolytique spécifique de la ficine est en moyenne de 5.40 μ g/mg.min,

L'activité protéolytique de l'extrait brut de la ficine est faible due à sa composition qui contient des protéines enzymatique autres que la ficine et également des protéines non enzymatiques.

I-4 Activité coagulante

Les résultats de la présente étude, indiquent que l'extrait brut de la ficine possède une activité coagulante en moyenne de 253UP. Cette valeur est proche à celle retrouvé par (Williams, Sgarbieri et al. 1968) qui rapportent une valeur de 320 UP.

Selon (Nouani, Dako et al. 2009) l'activité coagulante de l'extrait de ficine est de l'ordre de 1500UP, supérieure a la valeur retrouvé dans la présente étude.

Cette différence peut être attribuée à plusieurs facteurs, comme le caractère variétale, le sol et les conduites agronomique et le climats, ainsi que le taux d'ensoleillement (Durand and Chantraine 1982) .

Les résultats de la présente étude montrent que la force coagulante de l'extrait enzymatique de la ficine, qui exprime le nombre de volumes de lait coagulable par un volume de coagulant, est de 22771 (c'est à dire 1mLde l'extrait enzymatique coagule 22771mL du lait).

En termes de quantité de lait coagulable, un millilitre de cet extrait enzymatique peut coaguler environ 22.7 litres .Cette force est inferieure à celle rapportée par (Siar) et (Nouani, Dako et al. 2009) qui l'ont évaluées à 42059,76 et 40000, respectivement.

II. Détermination des conditions optimales de l'activité enzymatique d'extrait étudié

II-1 Effet de la température sur l'activité de l'extrait brut de la ficine

L'effet de la température sur l'activité enzymatique protéolytique de la ficine est déterminé par la mesure de l'activité enzymatique à différentes températures d'incubation (de 40 à 65 °C) avec un intervalle de 0,5.

Les résultats obtenus, de l'influence de la température sur l'activité coagulante de l'extrait brut de ficine, sont représentés dans la figure 3.

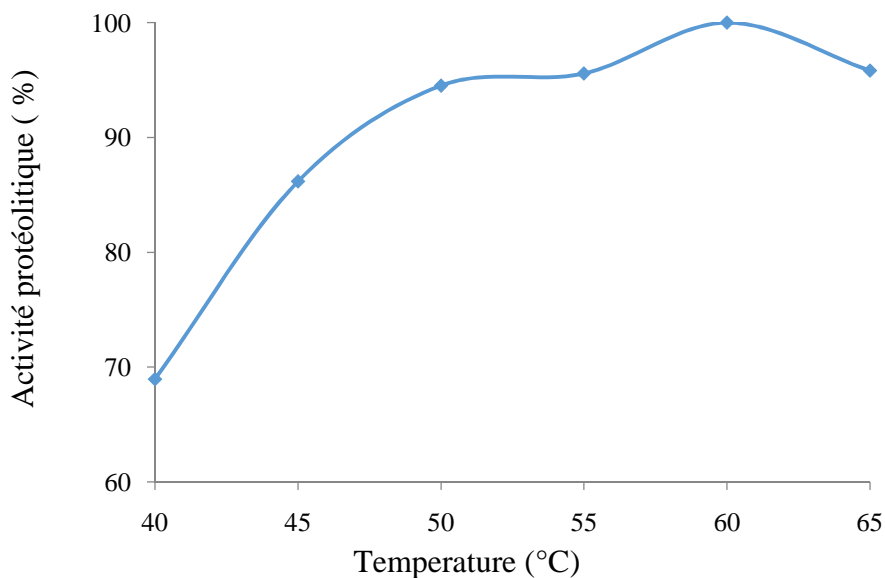


Figure 3: Représentation graphique de l'effet de la variation de la température sur l'activité protéolytique de la ficine.

D'après les résultats de la présente étude, l'activité enzymatique de l'extrait de ficine est dans son maximum dans l'intervalle de température 55°C à 60°C. Cependant, l'activité enzymatique est de 636,14 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{min}$ à 60°C, tandis que l'activité enzymatique de ficine diminue au delà de la température 65°C pour atteindre la valeur de 597,68 $\mu\text{g/ml}\cdot\text{min}$.

L'intervalle de température optimale obtenu pour l'activité enzymatique de l'extrait de ficine est identique à ce qui est retrouvé par (Gagaoua, Boucherba et al. 2014), ainsi que proche de celle retrouvée par (Fadyloğlu 2001), qui est de 60°C.

(Siar) ont rapporté que la température optimale de l'activité protéolytique de la ficine est de l'ordre de 75°C.

L'augmentation de la température a un effet positif sur la réaction, mais après une certaine activité thermique (65°C), elle diminue en raison de la dénaturation (Özer, Akardere et al. 2010; Kumar, Sathyaselvabala et al. 2012; Bayraktar and Önal 2013)

L'effet de la température résulte de la conjugaison de deux effets, l'un sur la réaction enzymatique, l'autre sur la phase secondaire de la coagulation et qui correspond à l'étape d'agrégation. En effet, la coagulation du lait ne peut avoir lieu qu'à des températures supérieures ou égales à 18 °C. Cela est due à l'importance des interactions hydrophobes dans l'agrégation des micelles hydrolysées (Horne and Banks 2004)

Le processus de l'inactivation de l'enzyme à des taux extrêmement élevés de température s'étale sur deux étapes, d'abord par l'ouverture partielle des structures ; secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme qui sont dues à la rupture des liaisons covalente et des liaisons hydrophobes. Plus loin la structure primaire de l'enzyme change car certains acides aminés sont endommagés par le chauffage (Masfufatun, Yasinta et al. 2017)

II.2. Effet de pH sur l'activité de l'extrait brut de la ficine

Le pH influence le fonctionnement des enzymes. De ce fait, il existe un pH optimal, autour duquel l'enzyme fonctionnera le mieux et sera plus efficace. Ce pH optimal, propre à chaque enzyme, se situe généralement pour la plupart des enzymes aux alentours de 7 (pH neutre). Plus on s'éloigne de cette valeur, plus l'enzyme est dénaturée.

Les résultats obtenus, de l'effet du pH sur l'activité coagulante de la ficine brute sont représentés dans la figure 4

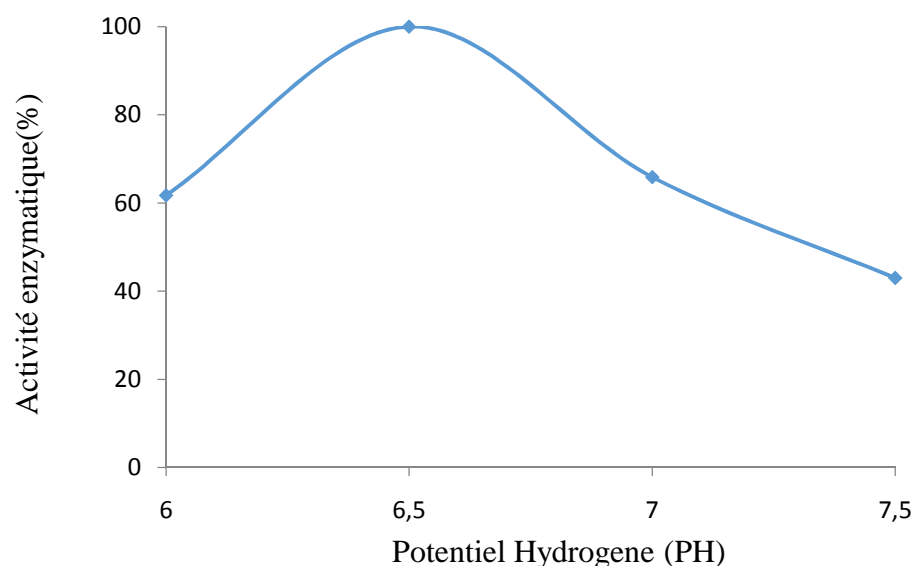


Figure 4: Représentation graphiques de l'effet de la variation du pH sur l'activité protéolytique de la ficine

Les résultats obtenus montrent que le pH optimal pour l'activité protéolytique de l'extrait de ficine étudié est de 6,5, pour une activité optimale d'environ de 7903,3mg/ml/min

Cette valeur du pH optimale de la présente étude, est proche à celle de obtenue par (Di Pierro 2013), qui ont estimé dans l'intervalle de 6 et 9.

Des résultats similaires ont été rapportées par (Kramer and Whitaker 1964). Ces derniers ont retrouvés que les différentes fractions de la ficine de *Ficus carica* étaient plus actives dans la gamme de pH neutre.

II-3 Effet de concentration du substrat (caséine bovine) sur l'activité de l'extrait brut de la ficine

L'effet de la concentration de la caséine du lait sur l'activité enzymatique protéolytique des extraits enzymatiques de latex de figuier *Ficus carica* étudiés est déterminé par la mesure de l'activité enzymatique à différentes concentrations de ce substrat (la caséine) (2-4-6-8 et 10mg/ml).

Les résultats obtenus, de l'effet de la concentration du substrat sur l'activité coagulante de la ficine brute, sont représentés dans la figure 5.

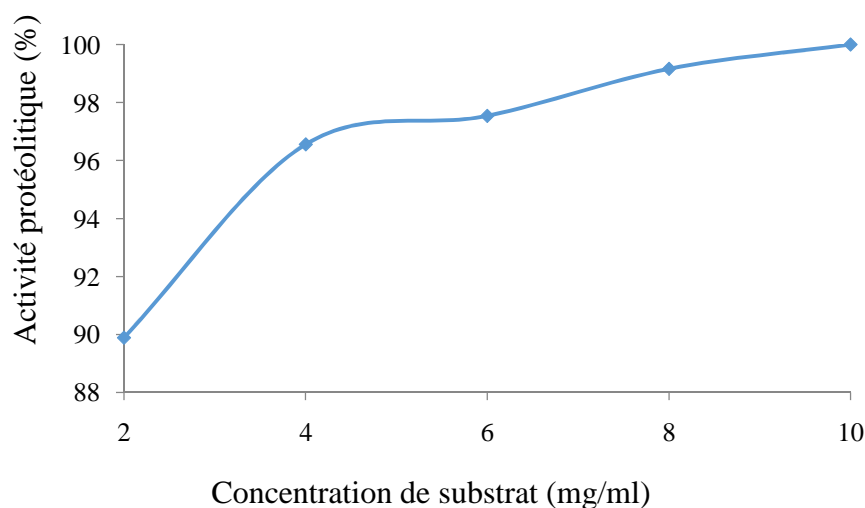


Figure 5: Représentation graphique de l'effet de la concentration du substrat sur l'activité protéolytique de la ficine.

Les résultats obtenus montrent que l'activité protéolytique de la ficine augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration de la caséine dans le milieu réactionnelle.

L'activité protéolytique la plus faible est enregistrée à la concentration de la caséine de l'ordre de $2\mu\text{g/ml}$, qui est estimée à $138.67\mu\text{g/ml.min}$. Cette activité augmente, avec une allure plus importante, pour atteindre la valeur $154.15\mu\text{g/ml.min}$ à la concentration de $10\mu\text{g/ml}$.

Plusieurs auteurs ont rapportés l'existence de corrélation linéaire hautement significative entre la concentration de substrat dans le milieu et le temps de coagulation (Gagaoua, Boucherba et al. 2014).

II-4 Effet de concentration du l'enzyme sur l'activité de l'extrait brut de la ficine

L'effet de la concentration de l'enzyme de la ficine sur l'activité enzymatique protéolytique des extraits enzymatiques de latex de figuier *Ficus carica* étudiés est déterminé par la mesure de l'activité enzymatique à différentes concentrations de cette enzyme à savoir : 10, 20, 30, 40, 50 et 60 mg/mL.

Les résultats obtenus, de l'effet de la concentration de l'enzyme, sur l'activité protéolytique de la ficine brute, sont représentés dans la figure 6.

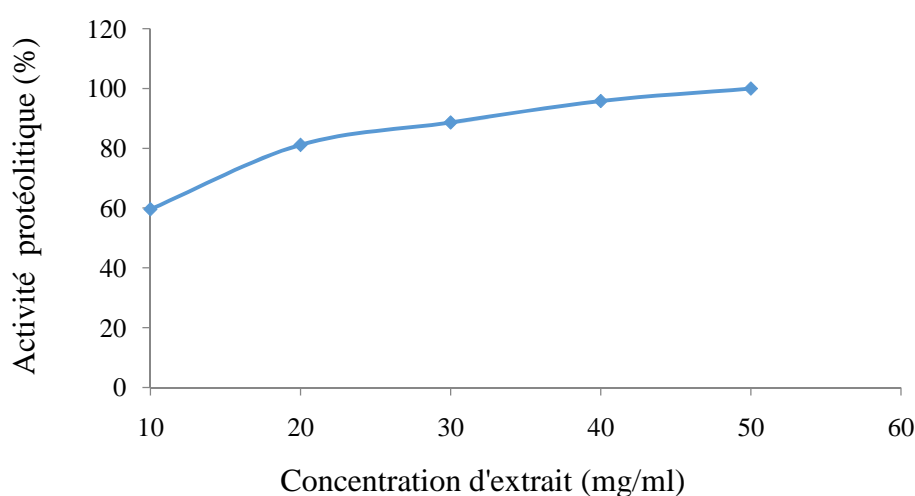


Figure 6: Représentation graphique de l'effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique de la ficine.

Les résultats de la présente étude, montrent que la concentration de l'enzyme influence l'activité protéolytique de la ficine, et l'augmentation de la concentration de l'enzyme dans le milieu réactionnel entraîne une augmentation de l'activité protéolytique de ce dernier.

L'activité protéolytique augmente au fur et à mesure que la concentration de l'enzyme augmente, dont l'activité la plus élevée (305,25 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{min}$) est enregistrée à 50 mg/ml de l'enzyme.

III Conditions optimales de l'activité coagulante de l'extrait de ficine étudié

La coagulation est influencée par plusieurs facteurs tels que la concentration en enzyme, le pH du lait, la teneur en calcium, la composition en caséines, la dimension des micelles et les traitements préalables du lait (Siar)

Afin de déterminer les conditions physicochimiques optimales de l'action de l'extrait enzymatique de ficine et l'influence de certains paramètres sur son activité ont été étudiées.

III-1 Effet de PH sur l'activité coagulante de la ficine

L'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait de ficine, a été étudié en ajustant le pH du lait (substrat de Berridge) aux valeurs de l'intervalle 5,5 à 7,5. La température d'incubation est fixée à 35 °C, et la concentration en CaCl_2 est de 0,01M.

Le pH optimal de coagulation du lait est déterminé par observation du temps de floculation le plus court.

Les résultats obtenus, de l'évolution de l'activité coagulante, de l'extrait enzymatique étudié en fonction du pH du lait, sont représentés dans la figure suivante.

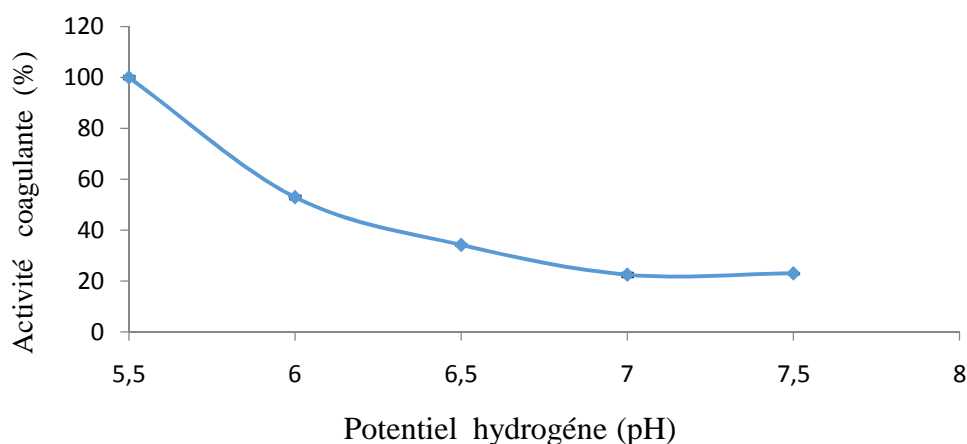


Figure 7 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de la ficine

Les résultats obtenus montrent une diminution de l'activité coagulante de la ficine au fur et à mesure que le pH du lait augmente. En effet, l'optimum d'activité est à pH 5,5 avec une activité coagulante 275 UP, et se stabilise environ de pH 7, avec une activité de l'ordre de 61,95 UP.

Ces résultats sont similaires de ceux rapportés par plusieurs auteurs. [Fadyloğlu \(2001\)](#), [Nouani, Dako et al. \(2009\)](#) et [Siar \(2014\)](#). Ces derniers, ont estimé que le pH optimal d'activité coagulante de la ficine est de l'ordre de 5.

[Bouachrine et Ouchene \(2017\)](#) l'activité coagulante optimale de la ficine est estimée à 911,794 UP pour un pH=5.

Les résultats obtenus, démontre que le pH joue un rôle très important dans la coagulation de lait sur la solubilisation du phosphate de calcium micellaire. Diminution de la charge nette des molécules de caséines et dissociation de caséine de la micelle avec un pH optimum de l'hydrolyse de la caséine- κ entre 5,1-5,5, donc lorsque le pH diminue, l'affinité de l'enzyme pour les micelles augmente et entraîne une augmentation de la vitesse de réaction. ([Fadyloğlu 2001](#)).

III-2 Effet de la température sur l'activité coagulante de la ficine

Pour étudier l'effet de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique étudiée, l'activité coagulante, à différentes températures d'incubation (de 30 à 65 °C) est mesurée, et les résultats obtenus sont représentés dans la figure 8.

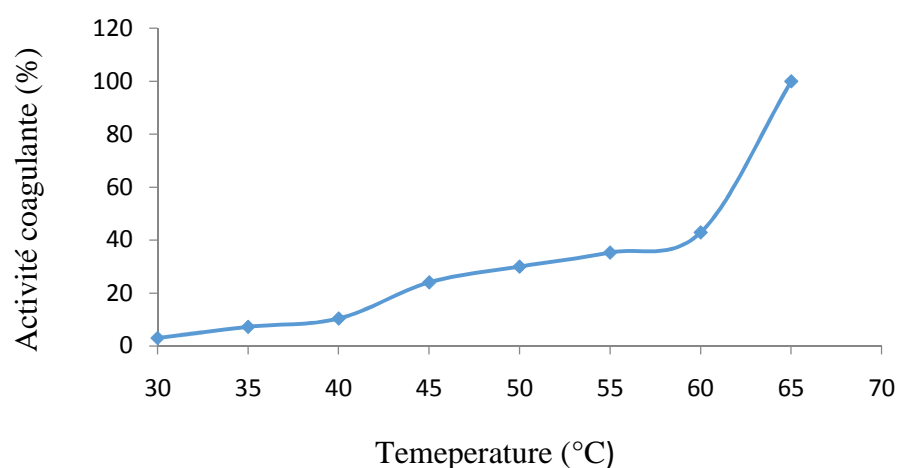


Figure 8: Effet de température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de la ficine

D'après les résultats obtenus, une augmentation de l'activité coagulante de la ficine au fur et à mesure que la température du lait augmente, suivant les températures étudiées, l'optimum d'activité coagulante pour l'extrait de ficine est obtenu à une température du lait égale à 65°C avec une activité de 3500 UP.

Ce résultat est proche de ceux rapportés par (Fadyloğlu 2001) et (Gagaoua, Boucherba et al. 2014), qui l'ont estimé à 60°C et inférieure à celle estimée par (Nouani, Dako et al. 2009) évalué à 80°C.

Ces résultats sont très similaires à celui rapporté par plusieurs auteurs (Devaraj, Kumar et al. 2008) et (Sugiura and Sasaki 1974) qui rapporté une activité enzymatique maximale de la ficine à l'intervalle de températures comprises entre 50 et 65°C.

Ces résultats confirment que la température a un effet sur le temps de coagulation du lait (vitesse de réaction enzymatique), et également la grande stabilité thermique de la ficine déclarée par plusieurs auteurs (Feijoo-Siota and Villa 2011) et (Bekhit, Hopkins et al. 2014)

III-3 Effet de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante de la ficine

Pour corriger les variations des teneurs en calcium du lait au cours du stade de lactation ou les modifications de l'équilibre du calcium provoqué par les traitements thermiques.

La concentration optimale en CaCl_2 du lait est déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait additionné de quantités de CaCl_2 variant de 0,005 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 et 0,05 M.

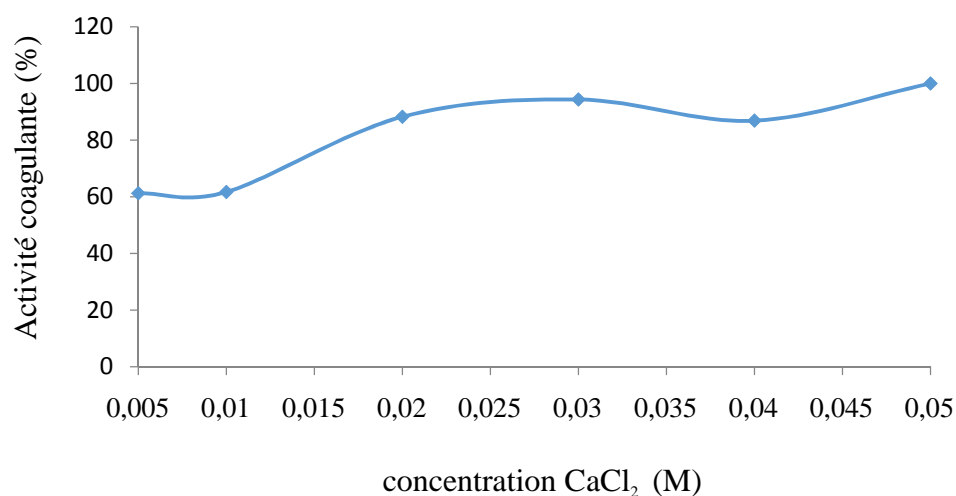


Figure 9: Effet de la concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de la ficine

Les résultats obtenus de la présente étude montrent que, pour l'intervalle de concentration en CaCl_2 étudié, l'activité coagulante augmente avec la concentration en CaCl_2 . L'optimum d'activité pour la ficine estimé à 406,976744 UP est obtenu à une concentration de 0,05 M. Cette concentration est supérieure à celle signalée par (Nouani, Dako et al. 2009) évaluée à 0,02 M de CaCl_2 .

Le fait d'ajouter du chlorure de calcium au lait provoque une baisse de son pH. Il s'agit probablement d'un échange d'ions H^+ par Ca^{++} sur la protéine. (Alais and Lagrange 1972).

IV Essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type « Camembert »

IV-1 Caractéristiques physico-chimie du lait

- Les résultats obtenus, de l'analyse des paramètres physicochimiques des différents laits utilisés pour l'élaboration de fromage à pâte molle type « Camembert »

Tableau II : Résultats physicochimique des laits utilisés pour la fabrication du fromage

Paramètre mesuré	Lait cru	Lait reconstitué avec poudre du lait écrémé	Lait mélange
pH	6.77	6.67	6.72
Acidité titrables (°D)	17	16	16.31
Extrait sec (%)	16.49	14.66	15.27
Humidité (%)	83.51	85.33	84.73
Teneur en sucre (g/l)	13.19	19.25	17.82
Teneur en protéine (g/l)	34.04	32	33.7

D'après les résultats obtenus montrent que les pH des laits utilisés varient entre 6.67 à 6.79. Ces résultats sont proche de ceux rapporté par la bibliographique, dont Douik, Ettriqui et al. (2003) ont retrouvé des valeurs de pH qui vont de 6.6 à 6.91, alors que Sina (1992) ont rapportés des valeurs de pH qui oscillent de 6.69 à 6.79.

Le potentiel d'hydrogène du lait est liée au climat, au stade de lactation, à la disponibilité alimentaire, et à l'état de santé des vaches (Labioui, Elmoualdi et al. 2009). L'acidité titrable des laits utilisés varient de 16 à 17°D. Ces valeurs sont très conformes aux normes exigées pour la production du fromage (AFNOR 1993), qui exigent une acidité du lait fixée entre 16-18°D. L'acidité du lait est attribuée surtout à l'acidité naturelle, qui caractérise le lait frais, c'est une acidité issue de l'hydrolyse du lactose en acide lactique par divers microorganismes (Labioui, Elmoualdi et al. 2009). La teneur en extrait sec des laits utilisés varie de 14.66 à 16.49 %. Le taux de protéine varie de 32 à 34.04g/l.

L'ensemble des résultats obtenus, confirment l'acceptabilité des laits utilisés pour l'obtention d'un fromage à pâte molle appréciable, en qualité de rendement fromagère, et organoleptiques, selon les normes AFNOR (1998).

V Résultats de l'analyse sensorielle

L'analyse sensorielle est la technique qui utilise les sens de l'homme pour connaître et décrire les caractéristiques organoleptiques d'un produit. Il s'agit bien d'analyser le produit seul en utilisant un sujet humain comme instrument de mesure et cette analyse est faite afin de connaître et de pouvoir choisir les tests les plus appropriés pour résoudre le problème posé.

Les résultats du test de dégustation, ainsi les préférences des deux fromages étudiés en se basant sur les caractères choisis sont illustrés dans la figure n°10.

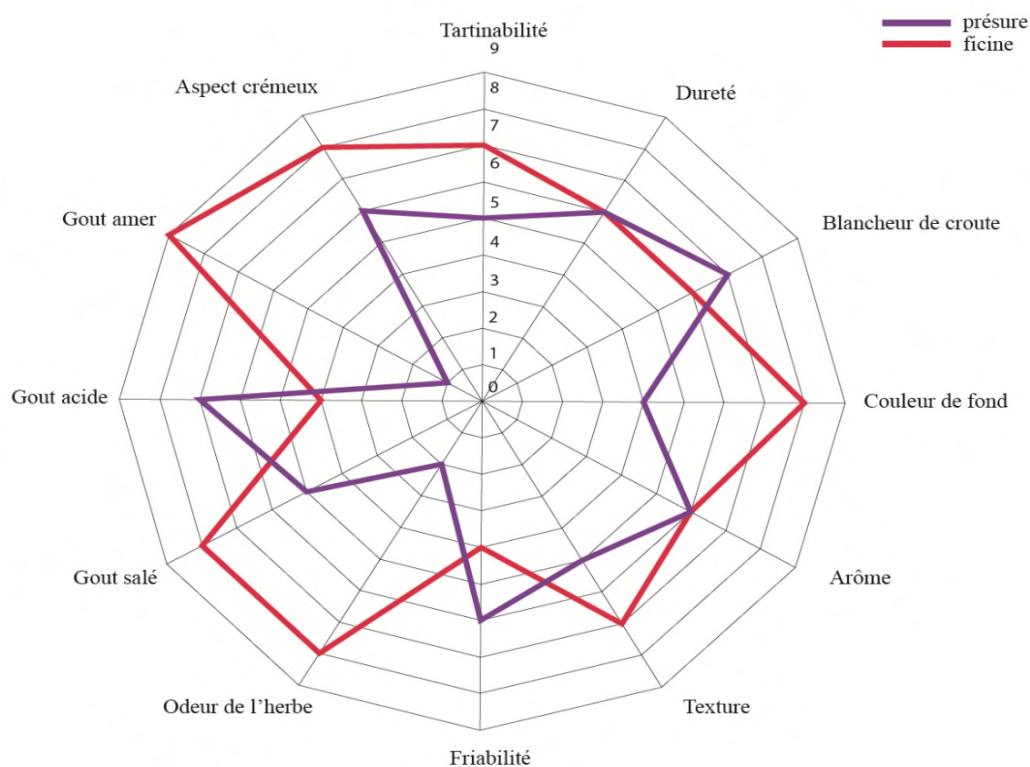


Figure 10 : Toile de préférence sensorielle entre le camembert issue de la coagulation par la ficine et par la présure (témoin industriel)

Du point de vue couleur, la croûte de camembert doit être blanche et fleurie, avec des moisissures superficielles qui donnent un feutrage blanc, et y avoir aussi quelques taches beige à jaune. Les bords peuvent être légèrement jaune, et la couleur de la pâte (fond) doit évoluer entre l'ivoire et le jaune clair, et ne doit jamais être blanche.

Les résultats de l'analyse sensorielle, concernant la couleur, montrent que les préférences sont presque identiques, avec légères privilèges du côté de camembert à ficine que à présure (Témoin).

Pour la texture, les dégustateurs ont apprécié le fromage obtenu avec l'extrait de la ficine, pour sa texture (crémeuse -moelleuse) qui est proche de celle du témoin (camembert présure). Cette texture peut être due à la nature du caillé obtenu qui est caractérisé par de grains de taille réduite. Par contre, le fromage témoin (camembert présure) est caractérisé par une pâte granuleuse et légèrement friable.

En effet, le développement de la texture de camembert s'effectue pendant l'affinage et dépend des conditions de déroulement de cette opération. Elle est due à l'activité protéolytique de complexe enzymatique et microbienne, ainsi qu'à la spécificité de son action sur les caséines.

Pour le goût, les dégustateurs ont jugés que le goût des fromages obtenus par l'extrait de ficine est amer mais acceptable, vu son attirance au salé et peu acide. Cette caractéristique a été constatée par plusieurs auteurs dans les fromages fabriqués avec la ficine (Öner and Akar 1993; Fadyloğlu 2001)

Le fromage témoin (issus de la coagulation par la présure microbienne), présente une un goût acide attirance moisi, due probablement à l'affinage poussé. Ne présente aucune amertume, mais peu salé.

Le camembert, issue de la coagulation ficine, présente une odeur d'herbe à l'encontre de camembert (témoin) à coagulation présure, qui présente une odeur moisie.

Au terme des résultats de l'étude sensorielle, il est a constaté que les deux camemberts, par rapport aux préférences étudiés, présentent beaucoup de point en communs, ce qui permet de croire a la possibilité de remplacer ou même de substituer la ficine avec la présure dans la fabrication des fromages ce type de fromage.

En effet, les paramètres, couleur et texture, et à moindre de gréle goût et l'odeur répandent aux exigences requises pour ce type de fromage et sont proches ou meilleure de ceux du fromage issu de la coagulation par la présure.

Cette étude a permis de contribuer aux travaux de recherche préexistants dans le domaine de l'industrie fromagère, et de renforcer l'idée de pouvoir trouver de nouvelles sources potentielles de succédanés de présure.

Ce travail visait la caractérisation d'un agent coagulant extrait à partir de latex du figuier *Ficus carica L.* et tester la possibilité de son utilisation dans la fabrication de fromages à pâte molle type « camembert ».

Pour atteindre l'objectif de l'étude, notre démarche a comporté deux étapes. En premier lieu, la récupération des matières premières renfermant le système enzymatique recherché, l'extraction de l'extrait brut de la ficine et sa caractérisation en déterminant sa teneur en protéines, ses activités coagulante et protéolytique ont été effectuées, ainsi que l'étude de l'influence des paramètres physicochimiques du lait (température, pH et $[CaCl_2]$, [caséines]), et la concentration en extrait enzymatique sur ses activités coagulante et protéolytique.

En seconde lieu, un fromage à pâte molle type « Camembert » a été élaboré en utilisant l'extrait brut de ficine comme coagulant, afin de tester la possibilité de son utilisation comme succédané de la présure.

Les résultats obtenus de la caractérisation physicochimique de l'extrait brut de ficine montrent que :

- Le rendement, après centrifugation (5000 tr/ 15 min à 4°C), est estimé à 74 ;
- Une activité coagulante de 251,01 UP;
- Une force coagulante de 22771 ;
- Une teneur en protéine de 66,24 mg/ml;
- Activité protéolytique est de 358 µg d'équivalent tyrosine/ml .min.

Les résultats obtenus, montrent que les conditions optimales d'activité de la ficine sont :

- Le pH optimal de coagulation pour l'extrait de ficine est évalué à 5,5. Pour la température, l'optimum d'activité pour la ficine est obtenu à une température de 65°C. Concernant la concentration en chlorure de calcium, l'optimum de la ficine est de 0,05 M.

L'essai de fabrication d'un fromage à pâte molle « camembert » par utilisation de l'extrait brut de ficine a donné un fromage appréciable, comparé à celui issu de la coagulation présure.

Au terme des résultats de l'étude sensorielle, il est constaté que les deux camemberts, par rapport aux préférences étudiés, présentent beaucoup de point en communs, ce qui permet de croire à la possibilité de remplacer ou même de substituer la ficine avec la présure dans la fabrication des fromages.

En effet, les paramètres, couleur et texture, et à moindre degré le goût et l'odeur répondent aux exigences requises pour ce type de fromage et sont proches ou meilleures de ceux du fromage issu de la coagulation par la présure.

Pour conclure, nous pouvons dire que les résultats obtenus semblent intéressants d'autant qu'ils montrent la possibilité d'obtention des extraits enzymatiques capables de remplacer la présure dans l'industrie fromagère. Cependant il est intéressant de compléter cette étude par :

- L'étude des différents facteurs influençant l'extraction de cet enzyme afin d'améliorer la qualité et le rendement d'extraction ;
- La purification et l'optimisation de l'enzyme afin d'envisager d'autres utilisations ;
- Aussi il est intéressant d'essayer d'appliquer l'extrait de la ficine pour la fabrication d'autres types de fromage.

Références Bibliographiques

- ❖ Abdelkader, B. "Extraction de la ficine de l'espèce *Ficus carica* et étude de ses caractéristiques biochimiques et de son effet antimicrobien sur quelques espèces bactériennes pathogènes."
- ❖ AFNOR, E. (1993). Guide général pour la sélection, l'entraînement et le contrôle des sujets, Partie.
- ❖ Aggad H, Mahouz F, Ammar YA and Kihal M (2009) Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. *Rev Méd Vét* **160**:590-595.
- ❖ Alais, C. (1984). "Principes des techniques laitières." *Science du Lait*: 196-197.
- ❖ Alais C and Lagrange A (1972) Etude biochimique d'une protéase coagulante produite par *Mucor miehei*. I. Activité coagulante et activité protéolytique. *Le Lait* **52**:407-427.
- ❖ Azarkan M, Matagne A, Wattiez R, Bolle L, Vandenameele J and Baeyens-Volant D (2011) Selective and reversible thiol-pegylation, an effective approach for purification and characterization of five fully active ficin (iso) forms from *Ficus carica* latex. *Phytochemistry* **72**:1718-1731.
- ❖ Bayraktar H and Önal S (2013) Concentration and purification of α -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning. *Separation and Purification Technology* **118**:835-841.
- ❖ Bekhit AA, Hopkins DL, Geesink G, Bekhit AA and Franks P (2014) Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical reviews in food science and nutrition* **54**:1012-1031.
- ❖ Benaouida, K. (2008). "Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnement des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum." Université Mentouri, Constantine.
- ❖ Benyahia-Krid F, Attia H and Zidoune M (2010) Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: interactions and microstructure. *Journal of Agriculture, Biotechnology and Ecology* **3**:75-86.
- ❖ BOUACHERINE, M. and Z. OUCHENE (2017). Valorisation d'un savoir faire Kabyle pour son application industrielle: Caractérisation d'un fromage à pâte molle fabriqué à partir du lait de vache coagulé avec l'enzyme du *Ficus carica* L, Université de Bouira.
- ❖ Boughellout, H. (2007). "Coagulation du lait par la pepsine du poulet." Mémoire magister, université Mentouri constantine, 69p.
- ❖ Bouyoucef Y, Taouzinet A and Bel Hamiche NE (2016) Obtention et caractérisation d'une protéase coagulante de *Penicillium* sp.

Références Bibliographiques

- ❖ Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* **72**(1-2): 248-254.
- ❖ Collin, J.-C. (2015). *Présures et coagulants de substitution: Comment faire le bon choix?*, Editions Quae.
- ❖ Devaraj KB, Kumar PR and Prakash V (2008) Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**:11417-11423.
- ❖ Di Piero G (2013) Enzymatic characterization of two plant coagulants: *Cynara cardunculus* L. and *Ficus carica* L.
- ❖ Douik R, Ettriqui A and Zrelli S (2003) Relation entre le test à l'alcool et la qualité du lait à la réception. *MHA* **15**:19-26.
- ❖ Durand J-R and Chantraine J-M (1982) L'environnement climatique des lagunes ivoiriennes. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale* **15**:85-113.
- ❖ Faccia M, Picariello G, Trani A, Loizzo P, Gambacorta G, Lamacchia C and Di Luccia A (2012) Proteolysis of Caciocotta cheese made from goat milk coagulated with caprifig (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *European Food Research and Technology* **234**:527-533.
- ❖ Fadýlođlu S (2001) Immobilization and characterization of ficin. *Food/Nahrung* **45**:143-146.
- ❖ Feijoo-Siota L and Villa TG (2011) Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess technology* **4**:1066-1088.
- ❖ Fox P (2003) Milk proteins: general and historical aspects, in *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins* pp 1-48, Springer.
- ❖ Gagaoua M, Boucherba N, Bouanane-Darenfed A, Ziane F, Nait-Rabah S, Hafid K and Boudechicha H-R (2014) Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. *Separation and Purification Technology* **132**:461-467.
- ❖ Green, M. L. and A. Stackpoole (1975). "The preparation and assessment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase–swine pepsin mixture for Cheddar cheese-making." *Journal of Dairy Research* **42**(2): 297-312.
- ❖ Grzonka Z, Kasprzykowski F and Wiczak W (2007) Cysteine proteases, in *Industrial enzymes* pp 181-195, Springer.

- ❖ Hamer Laine, S. and A. Zoubiri (2018). Caractérisation d'un fromage frais "Agougli" fabriqué à partir du lait de chèvre coagulé avec l'enzyme du *Ficus carica* L, Université de Bouira.
- ❖ Holt C, De Kruif C, Tuinier R and Timmins P (2003) Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **213**:275-284..
- ❖ Horne D and Banks J (2004) Rennet-induced coagulation of milk. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* **1**:47-70.
- ❖ Huppertz T, Upadhyay V, Kelly A and Tamime A (2006) Constituents and Properties of Milk from Different Species. Brined cheeses, Blackwell Publishing Ltd.
- ❖ Jeantet, R., T. Croguennec, et al. (2017). Initiation à la technologie laitière, Editions Tec & Doc Lavoisier.
- ❖ Katsaros G, Katapodis P and Taoukis P (2009) High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain. *Journal of Food Engineering* **91**:42-48
- ❖ Kramer DE and Whitaker JR (1964) Ficus enzymes II. Properties of the proteolytic enzymes from the latex of *Ficus carica* variety Kadota. *Journal of biological chemistry* **239**:2178-2183.
- ❖ Kumar, S., N. S. Sharma, et al. (2005). "Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization." *Process Biochemistry* **40**(5): 1701-1705.
- ❖ Labioui H, Elmoualdi L, Benzakour A, El Yachioui M, Berny E and Ouhssine M (2009) Etude physicochimique et microbiologique de laits crus. *Bull Soc Pharm Bordeaux* **148**:7-16.
- ❖ Lapointe-Vignola C (2002) *Science et technologie du lait: transformation du lait*, Presses inter Polytechnique.
- ❖ Lazzouni I Hydrolyse des caséines bovines par des protéases végétales en vue de réduire leur allergénicité.
- ❖ Libouga D, Vercaigne-Marko D, Djangal SL, Choukambou I, Ebangi A, Ombionyo M, Beka R, Aboubaka T and Guillochon D (2006) Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*. *Tropicult* **24**:229-238.
- ❖ Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry* **193**:265-275.
- ❖ Lynn K and Clevette-Radford N (1986) Ficin E, a serine-centred protease from *Ficus elastica*. *Phytochemistry* **25**:1559-1561.

Références Bibliographiques

- ❖ Masfufatun SLB, Yasinta MS and Ni'matuzahro AB (2017) SERUM ACETALDEHYDE AS A POTENTIAL BIOMARKER. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* **52**:1032-1038.
- ❖ Mawa S, Husain K and Jantan I (2013) Ficus carica L.(Moraceae): phytochemistry, traditional uses and biological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**..
- ❖ Mechakra A, Auberger B, Remeuf F and Lenoir J (1999) Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sciences des aliments* **19**:663-675.
- ❖ Muehlhoff E, Bennett A and McMahon D (2013) *Milk and dairy products in human nutrition*, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- ❖ Nicotra G, Vicentini S and Mazzolari A (2010) Research and development of a dry extract. *Nutrafoods* **9**:27-30
- ❖ Nouani A, Dako E, Morsli A, Belhamiche N, Belbraouet S, Bellal M and Dadie A (2009) Characterization of the purified coagulant extracts derived from Artichoke Flowers (*Cynara scolymus*) and from the Fig Tree Latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J Food Technol* **7**:20-29.
- ❖ Öner M and Akar B (1993) Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilization in gaziantep cheese production. *LWT-Food Science and Technology* **26**:318-321.
- ❖ Özer B, Akardere E, Çelem EB and Önal S (2010) Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. *Biochemical Engineering Journal* **50**:110-115.
- ❖ Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I and Luis A (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant physiology and Biochemistry* **40**:521-530.
- ❖ Ramet, J. (1985). "Study of enzymatic coagulation of camel milk. Report on a consultancy to the Government of the Kingdom of Saudi Arabia."
- ❖ Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS and Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:597-635
- ❖ Shah MA, Mir SA and Paray MA (2014) Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Science & Technology* **94**:5-16.
- ❖ Siar E-H Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait.

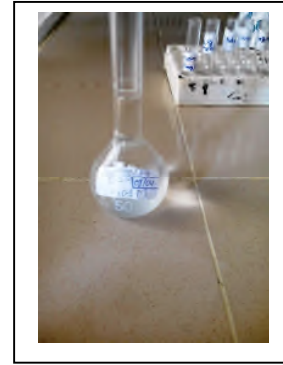
Références Bibliographiques

- ❖ Sina L (1992) Contrôle de qualité du lait et des produits laitiers fabriqués par la SOCA. *Th Méd Vét EISMV, Dakar*, 33 **223**.
- ❖ Singh, H. and R. J. Bennett (2002). "Milk and milk processing." *Dairy Microbiology Handbook*: 1-38.
- ❖ Sugiura M and Sasaki M (1974) Studies on proteinases from *Ficus carica* var. Hōraishi. V. Purification and properties of a sugar-containing proteinase (Ficin S). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* **350**:38-47.
- ❖ Solomon A, Golubowicz S, Yablowicz Z, Grossman S, Bergman M, Gottlieb HE, Altman A, Kerem Z and Flaishman MA (2006) Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* **54**:7717-7723.
- ❖ Sullivan, G. A. and C. Calkins (2010). "Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue." *Meat science* **85**(4): 730-734.
- ❖ Walstra P (1999) *Dairy technology: principles of milk properties and processes*, CRC Press.
- ❖ Williams DC, Sgarbieri VC and Whitaker JR (1968) Proteolytic activity in the genus *Ficus*. *Plant physiology* **43**:1083-1088.

Annexe I : Préparation de la solution de BSA :

0.05g de BSA dans 50ml →

(On le laisse à 4°C pendant une journée)

**Annexe II : Préparation de bleu de coomassie :**

- ✚ 0,1g de bleu de coomassie G250 ;
- ✚ 50ml d'éthanol à 95% avec agitation ;
- ✚ 100ml d'acide phosphorique à 85% ;
- ✚ compléter avec l'eau distillée jusqu'à un volume de 1000 ml ;
- ✚ Ce réactif doit être conservé à 4°C et à l'abri de la lumière.



Annexe III : Dosage des protéines par méthode de Bradford :

Gamme d'étalant de la BSA

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumin bovine (BSA) (1mg/ml) selon les quantités suivantes : 0, 100, 200, 300, 400 et 500 µl. Toutes les dilutions des solutions protéiques sont effectuées en présence de l'eau distillée. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 500µl. Après addition de 2ml du réactif de Bradford et agitation, la solution est laissée à l'obscurité 15min puis l'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc.

Tableau I : Préparation de la gamme d'étalonnage de la SAB (1mg/ml).

Concentration	0,2	0,16	0,12	0,08	0,04	Blanc
SM (µl)	500	400	300	200	100	0
Eau distillé (µl)	0	100	200	300	400	500
Volume total (µl)	500	500	500	500	500	500
Bleu de coomassie (ml)	2	2	2	2	2	2
Absorbance à 595 nm	0,107	0,076	0,05	0,042	0,011	0

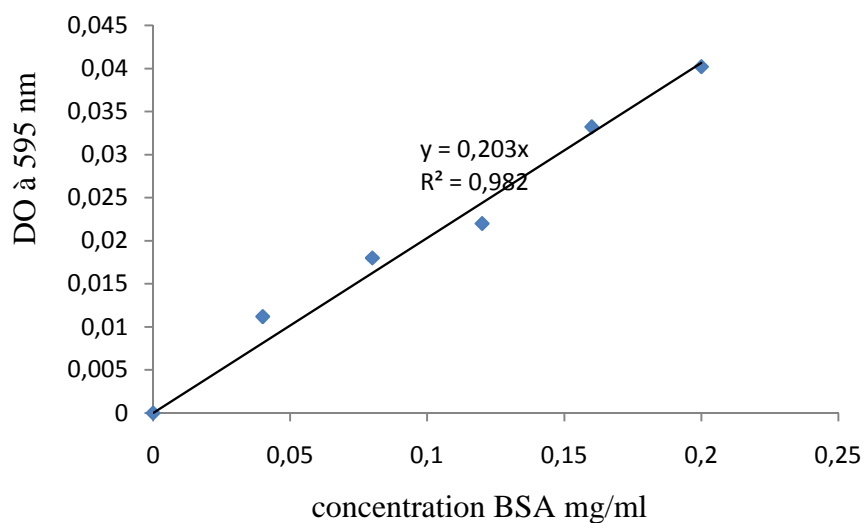


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de la solution de SAB (1mg/mL) Bradford, (1976).

Annexe IV : Mesure de l'activité enzymatique

❖ Gamme d'étalonnage de la Tyrosine

Tableau II : préparation de la courbe d'étalonnage de la tyrosine

Concentration (μl)	0	8	16	24	32	40
SM (μl)	0	100	200	300	400	500
V (Tampon phosphate)	500	400	300	200	100	0
Volume total 500(μl)	500	500	500	500	500	500
Ajouter 250μl de la solution C						
Incubation au bain marie à 35C° pendant 10min						
Ajouter 250μl de réactif de folin $\frac{1}{2}$						
Ré incubation à 35C° pendant 20min						
Abs à 660nm	0	0,249	0,512	0,803	0,964	1,198

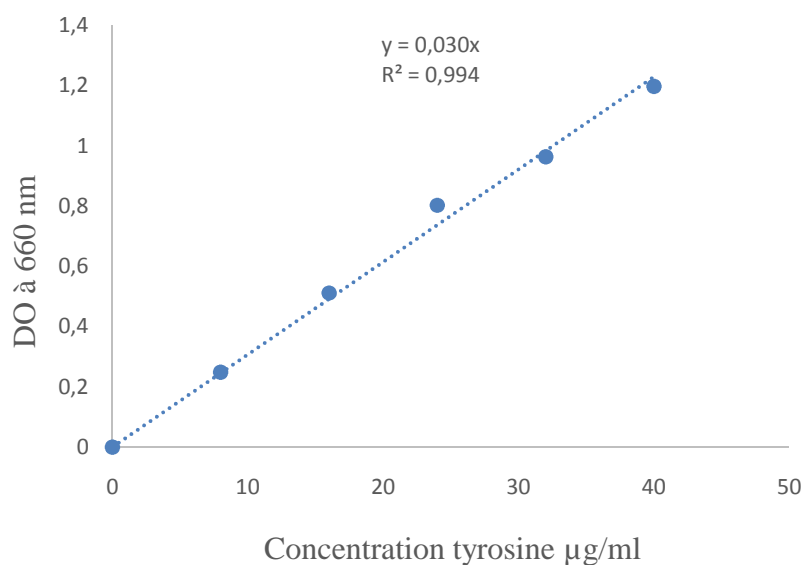


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine

Annexe V : Dosage des sucres totaux du lait

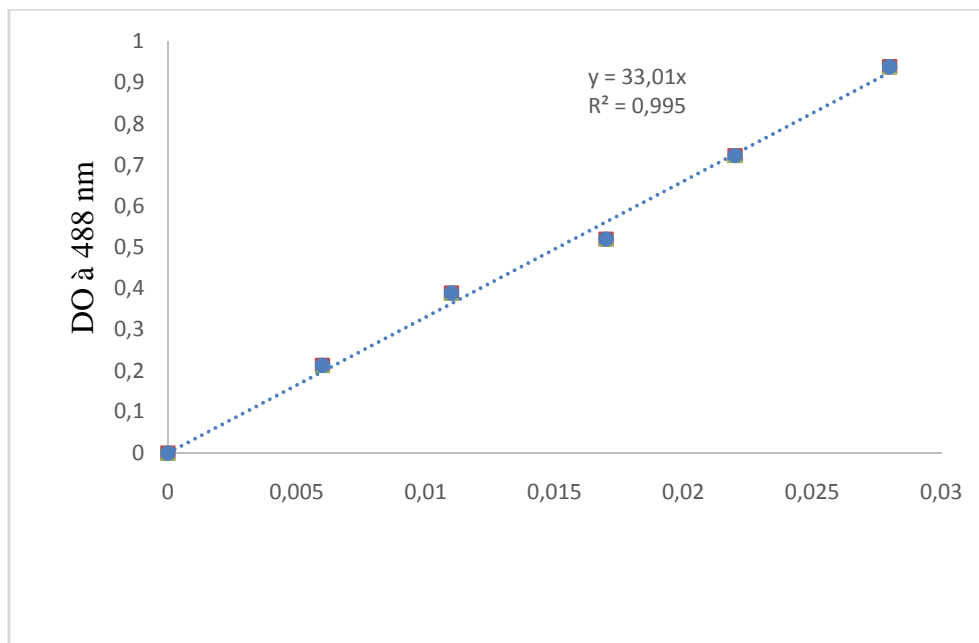


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de Glucose

Annexe VI : Préparation des solutions

-tampon phosphate (0,1M ; PH=7)



Na_2HPO_4 → 0,1M Concentration mg/ml

$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ → 0,1M (acide forte)

- masse molaire (Na_2HPO_4) = 177,99g/mol

177,99g → 1mol

$$X_1 = (177,99 \times 0,1) \div 1 = 17,799\text{g}$$

X_1 → 0,1mol

17,799g → 1000ml

X₂ → 100ml

$$X_2 = (17,799 \times 100) \div 1000 = \mathbf{1,77g}$$

- **Masse molaire (Na₂H₂PO₄)=156,01g/mol**

156,01g → 1mol

$$X_1 = (156,01 \times 0,1) \div 1 = \mathbf{15,01g}$$

X₁ → 0,1mol

15,601g → 1000ml

X₂ → 100ml

$$X_2 = (15,601 \times 100) \div 1000 = \mathbf{1,5g}$$

- **CaCl₂ (0,01M)**

Masse molaire (CaCl₂)= 110,98 g/mol

110,98 g → 1000 ml

$$x = (111,98 \times 200) \div 1000 = \mathbf{22,19g}$$

X → 200 ml

Dans notre flacon CaCl₂ contiens 6 molécules H₂O

$$(22,19 \times 146) \div 111,98 = 29,19g$$

Annexe VII : Tableau III : les statistiques de la figue des communes de la wilaya de Bejaia

Communs subdivisions wilaya	Superficies occupée (ha)	Nombre total de figuiers	Nombre de figuiers en rapport	Production			
				En figue fraîche			En figue sèche
				Consommation a l'état frais	Soumise au séchage	Total	
Timezrit	100	7600	7600	1200	3500	3700	1600
Semaoun	228	12540	12540	3000	6000	9000	3000
Faroun	599	53450	53130	9000	12000	21000	6000
B Djelil	1237	86600	85700	10000	21000	31000	1200
Barbacha	1000	52000	52000	12000	21000	33000	10000
Kendira	700	35000	35000	5000	10000	15000	75000
Seddouk	267	24026	24026	2000	2000	4000	1000
Amalou	468	11700	11700	12000	4000	16000	2000
M'cissina	907	93090	93090	10000	6000	16000	3000
Bouhamza	178	26650	26650	4000	2000	6000	1000
Beni maouche	1005	138100	135300	11000	20000	31000	10000
Total aire communes du l'aire IG	6689	54756	536736	79200	106500	18500	57100
Total wilaya	10302	993961	986811	155220	139780	295000	73590

Annexe VIII : Exemple d'un questionnaire d'évaluation sensorielle

Date :..... Age :..... Sexe :.....

Deux échantillons de fromage frais codé 1 et 2 vous sont présentés. Il vous est demandé de examiner et goûter chaque un des deux échantillons, puis donnez une note de 1 à 9 selon l'intensité de chaque caractère.

Si le caractère mentionné dans la fiche n'est pas détecté dans le produit, vous mettez 0.

NB : Veuillez rincer votre bouche à chaque dégustation d'un échantillon

	Ficine	Présure
Blancheur de croûte	6	7
Couleur de fond (pâte)	8	4
Arome	6	6
Texture	7	5
Aspect crémeux	8	6
Friabilité	4	6
Tartinabilité	7	5
Dureté	6	6
Odeur herbe	8	2
Gout salé	8	5
Gout acide	4	7
Gout amer	9	1

Annexe IX : Appareillage utilisé

- Bain marie
- Balance de précision à 0,01g (SARTORIUS);
- Centrifugeuse (SIGMA) ;
- Etuve

- pH mètre (Hanna-instruments) ;
- Plaque chauffante
- Plaque magnétique (VELP)
- Spectrophotomètre UV-Visible (SCHIMADZU, Japon) ;
- Réfrigérateur (LG)

Un certain nombre de petit matériel approprié a été également utilisé dans cette étude. Il s'agit de : micropipettes, seringues, eppendorfs, spatule en inox et équipements de protection individuelle (gant, masque respiratoire, blouse,...) ainsi que différents types de verrerie (béchers, fioles jaugées, fiole à vide, pipette graduées, tubes à essais, tubes à centrifugation, burette, butyromètres, ...).

Produits et réactifs spécifiques

- Colorants et réactifs : bleu de Coomassie G-250, TCA 5%, acide sulfurique, tyrosine, réactif de Folin-Ciocalteu, carbonate de sodium, tartrate sodium-potassium, sulfate de cuivre, NaOH, Na_2HPO_4 , phénol, HCl, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, ...).
- sérum albumine bovine (BSA)
- Caséine
- Chlorure de calcium
- Glucose

Résumé

L'objectif de la présente étude, est d'étudier la possibilité de substituer la présure par la ficine comme agent coagulant végétal du lait. L'extraction de la ficine à partir de latex du figuier *Ficus carica*L. et la caractérisation de l'extrait enzymatique obtenu par la détermination de l'activité coagulante, la force coagulante et l'activité protéolytique a été effectuée. Les paramètres optimaux à savoir le pH, la température, la concentration en CaCl₂, et leur influence sur l'activité enzymatique de l'extrait brute de la ficine, ont été étudiés. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait de la ficine présente une activité coagulante de 253,01UP, une force coagulante de 22771, et une activité protéolytique estimée à 358 µg/ml/min d'équivalent tyrosine/ml /min d'extrait de la ficine.

Un fromage à pâte molle type « Camembert » a été préparé à partir du lait reconstitué (poudre du lait, et lait de vache cru) coagulé avec l'extrait de ficine. Les résultats obtenus, de l'analyse sensorielle, ont montré que ce fromage possède une qualité organoleptique meilleure que celle de fromage témoin (texture plus molle avec un goût amer très apprécié). Les résultats de l'étude ont démontrés que l'extrait de la ficine peut remplacer la présure dans la fabrication fromagère et cette étude mérite d'être élargie dans la fabrication de différents types de fromage.

Mot clé : *Ficus carica*, ficine, activité enzymatique, force coagulante, fromage « Camembert »

Abstract

The objective of the present study is to study the possibility of substituting rennet with ficin as a vegetable coagulant agent for milk. Extraction of ficin from *Ficus carica* L. fig tree latex and characterization of the enzymatic extract obtained by the determination of coagulant activity, coagulant strength and proteolytic activity was performed. The optimal parameters, namely pH, temperature, CaCl₂ concentration, and their influence on the enzymatic activity of the crude extract of ficin, were studied. The results obtained showed that the ficin extract has a coagulating activity of 253.01UP, a coagulant force of 22771, and an estimated proteolytic activity of 358 µg / ml / min of tyrosine equivalent / ml / min of extract. ficin.

A soft cheese type "Camembert" was prepared from reconstituted milk (milk powder, and raw cow's milk) coagulated with ficin extract. The results obtained, from the sensory analysis, show that this cheese has an organoleptic quality better than that of control cheese (softer texture with a very appreciated bitter taste). The results of the study showed that ficin extract can replace rennet in cheese making and this study deserves to be expanded in the manufacture of different types of cheese.

Keyword: *Ficus carica*, ficine, enzymatic activity, coagulating force, cheese "Camembert"