

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Alimentaires
Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire



Mémoire de fin de cycle en
vue de l'obtention du diplôme de
MASTER

Thème

**Etude comparative de la coagulation du lait sous
l'effet d'une protéase : la présure et la ficine**

Présenté par :

M^{me} KHERBOUCHE-BELKACEMI Naima

Soutenu le : 30 juin 2019

Jury

M^{me} ADJEROUD N.

Maitre de Conférences B

Président

M^r BOUKHALFA F.

Maitre de Conférences B

Promoteur

M^{me} TAZRART K.

Maitre de Conférences B

Examineur

Année universitaires : 2018 / 2019

Dédicaces

Je tiens à dédier ce travail à :

*Mon très cher mari KHERBOUCHE Idir qui m'a motivé et
soutenu tout au long de ce travail;*

Mes deux vrais trésors : LYDIA et YANIS ;

Mes très chères parents ; pour leur encouragement ;

Ma belle famille ainsi que toute la famille KHERBOUCHE;

Ma meilleure amie CHERTOUK Louiza Ludmila ;

Tous mes amis.

*En fin, sans oublier tout ceux ou toutes celles qui ont contribués de
prés ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

Remerciements

J'exprime toute ma gratitude et mes sincères remerciements à mon promoteur Mr BOUKHALFA Farid, pour avoir accepté de m'encadrer, pour ses conseils, ses orientations ainsi que pour la confiance qu'il m'a donnée tout au long de la réalisation de ce travail.

Je remercie également M^{me} BELHAMICHE Nabila, pour son aide précieuse.

Que mes vifs remerciements aillent à Mr BOUKHATA Atmane, directeur de production de la Laiterie SOUMMAM d'AKhou pour m'avoir facilité la réalisation de mon travail au sein de cette entreprise.

Un grand merci à Mr ALLOUT Nadir, Directeur du laboratoire recherche et développement (LRD) de la Laiterie SOUMMAM, pour son soutien et tous ses conseils scientifiques. Je remercie également son équipe, pour leur aide précieuse et leur disponibilité.

J'exprime ma reconnaissance à tous le personnel du laboratoire de contrôle de qualité, à leur tête M^{me} MAHLOUL Malika, Mr TAALBA Safim et Mr HAMITOUCHE Brahim pour leur aide technique et scientifique ainsi que pour leur disponibilité et gentillesse.

Que tous les participants des séances d'évaluation sensorielle descriptive trouvent ici, l'expression de ma sincère gratitude pour leur disponibilité et leur application.

J'exprime ma reconnaissance à M^{me} ADJEROUD Nawel qui a accepté de présider le jury, et je remercie également M^{me} TAZRART Karima, qui ma fait l'honneur d'être l'examinatrice de ce mémoire.

Sommaire

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

I. Fromage.....	3
I.1. Généralité	3
I.2. Fromage frais.....	3
I.3. Enzymes coagulantes utilisées en technologie fromagère.....	3
I.3.1. Caractéristiques des enzymes coagulantes d'origine animale.....	4
I.3.2. Coagulants végétaux.....	5
I.3.3. Coagulants microbiens.....	5
I.3.4. Chymosine produite par génie génétique	6
II. Coagulation du lait.....	6
II.1. Définition.....	6
II.2. Mécanisme de la coagulation.....	7
II.2.1. Substrat spécifique intervenant dans la coagulation.....	7
II.2.2. Coagulation acide.....	7
II.2.3. Coagulation enzymatique.....	7
III. Ficine.....	9
III.1. Généralités sur le figuier.....	9
III.1.1. Classification botanique du figuier.....	9
III.2. Localisation du système enzymatique dans le végétal.....	9
III.3. Caractérisation et mécanisme d'action de la ficine.....	11

Matériel et méthodes

I. Matériel enzymatique.....	12
I.1. Collecte et préparation d'extrait enzymatique de la ficine.....	12
I.2. Préparation de l'extrait enzymatique de présure.....	13
II. Caractérisation physico-chimique de l'extrait brute de la ficine et de la présure.....	13
II.1. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques.....	13
II.2. Mesure des activités enzymatiques.....	13
II.2.1. Détermination de l'activité protéolytique.....	13

II.2.2. Evaluation de l'activité coagulante.....	15
III. Etude des paramètres influençant l'activité enzymatique.....	16
III.1. Effet de la température sur l'activité coagulante.....	16
III.2. Effet de pH sur l'activité coagulante.....	16
III.3. Effet de la concentration de chlorure de calcium sur l'activité coagulante.....	17
III.4. Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique.....	17
IV. Etude comparatives entre deux fromages frais élaborés par chaque extrait enzymatique.....	17
IV.1. Analyse physico-chimique de la poudre de lait.....	17
IV.1.1. Mesure du potentiel d'hydrogène.....	18
IV.1.2. Détermination du taux d'humidité.....	18
IV.1.3. Détermination de l'acidité.....	18
IV.1.4. Détermination de la teneur en matière grasse.....	18
IV.1.5. Détermination de la teneur en protéines.....	19
IV.2. Elaboration de fromage frais par l'extrait enzymatique de la ficine et de présure.....	20
IV.3. Analyse physico-chimique du fromage et du lactosérum.....	22
IV.3.1. Mesure du pH.....	22
IV.3.2. Mesure de l'acidité.....	22
IV.3.3. Détermination de l'extrait sec total.....	23
IV.3.4. Détermination du taux de protéines.....	23
IV.3.5. Détermination du taux de lactose.....	23
V. Analyse sensorielle des fromages.....	23

Résultats et discussions

I. Caractérisation des activités enzymatiques des extraits.....	25
I.1. Teneur en protéines.....	25
I.2. Activité protéolytique.....	26
I.3. Activité coagulante.....	26
II. Détermination des conditions optimales de coagulation des extraits enzymatiques étudiés.....	27
II.1. Effet de la température sur l'activité de l'extrait brut de la ficine et de présure...	27
II.2. Effet du pH sur l'activité de l'extrait brut de la ficine et de présure.....	29
II.3. Effet de la concentration en chlorure de calcium sur l'activité de l'extrait brut de la ficine et de présure.....	31
II.4. Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique	

de l'extrait brut de la ficine et de présure.....	33
III. Etude comparatives entre deux fromages frais élaborés par chaque extrait enzymatique	34
III.1. Caractérisation physico-chimique de la poudre de lait.....	34
III.2. Caractérisation physico-chimique du fromage.....	34
III.3. Caractérisation physico-chimique du lactosérum.....	35
IV. Résultats de l'analyse sensorielle.....	35
Conclusion et perspectives.....	39
Références bibliographique.	
Annexe.	
Résumé.	

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

°D : Degré Dornic

BSA : Bovin Sérum Albumine

CMP : Caséinomacropéptide

Da, kDa: Dalton, Kilo Dalton

DLC : Date Limite de Consommation

E.C : Enzyme Commission

ESD : Extrait Sec Dégraissé

EST : Extrait Sec Total

FAO : Food and Agriculture Organization

FIL : Fédération Internationale du Lait

FTIR : Fourier Transform InfraRed spectroscopy

ISO : International Standard Organization

MG : Matière Grasse

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pH : Potentiel d'Hydrogène

TCA: Tri Chloroacetic Acid

U.A.C. : Unité d'Activité Coagulante

U.P. : Unité Présure

Liste des figures

Figure 1 : Hydrolyse de la caséine κ par la présure.....	8
Figure 2 : Photographie représentative du latex.....	10
Figure 3 : Diagramme d'extraction de l'extrait brut de la ficine.....	12
Figure 4 : Préparation du lait reconstitué.....	20
Figure 5 : Pasteurisation du lait.....	20
Figure 6 : Séparation du lactosérum et récupération du caillé.....	21
Figure 7 : Fromage frais.....	22
Figure 8 : Lactosérum obtenu.....	22
Figure 9 : Représentation graphique de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.....	28
Figure 10 : Représentation graphique de l'influence du pH sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.....	30
Figure 11 : Représentation graphique de l'influence de la concentration du CaCl_2 sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.....	32
Figure 12 : Représentation graphique de l'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique des extraits enzymatiques étudiés....	33
Figure 13 : Histogramme des résultats de l'analyse sensorielle des deux fromages étudiés.....	36
Figure 14 : Histogramme des résultats de l'analyse sensorielle des deux fromages étudiés.....	38

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques physicochimiques des extraits enzymatiques étudiés.....25
Tableau II: Résultats des analyses physicochimiques des poudres de lait.....34
Tableau III : Résultats des analyses physicochimiques du fromage.....34
Tableau IV: Résultats des analyses physicochimiques du lactosérum.....35

Introduction

Le lait par ses grandes qualités nutritionnelles, a toujours été considéré comme un aliment à part entière, mais sa consommation a souvent été limitée en raison de sa grande instabilité, l'irrégularité de sa production attachée au caractère saisonnier, et sa grande fragilité. Ceci a incité les producteurs à rechercher d'autres formes pour préserver ses qualités nutritionnelles, ainsi que de prolonger sa disponibilité dans le temps, ce qui a conduit à l'apparition de la technologie fromagère (Jeantet et al., 2017).

La fabrication du fromage, repose essentiellement sur la transformation du lait vers le caillé, le plus souvent par l'utilisation de la présure. Cette dernière, est une protéase, extraite de l'estomac des jeunes veaux. Sous l'action de cette enzyme, la caséine colloïdale du lait est transformée en paracaséinate de calcium insoluble, provoquant ainsi la séparation du sérum, et la formation d'un caillé facile à contracter, qui facilitera les opérations ultérieures, telles que le découpage, l'égouttage et la cuisson, permettant d'expulser les dernières traces de sérum présent (Génin, 1968; Nouani et al., 2009).

Les prix relativement élevés des préparations commerciales de présure et les difficultés d'approvisionnement, à l'encontre de la baisse de production de la viande et la hausse des prix, ainsi que les nouvelles tendance des régimes alimentaires (lacto-végétarisme), les restrictions religieuses (halal et cachir), et l'interdiction de la présure de veau recombinante dans de nombreux pays européens (France, Allemagne et Pays-Bas) (Génin, 1968), ont suscité la recherche de nouveaux succédant à la présure.

Ces raisons ont fait que de nombreuses recherches ont été entreprises afin de trouver des succédanés efficaces et compétitifs utilisables industriellement.

Selon le ministère du commerce, l'Algérie se considère l'un des plus grands consommateurs de lait et ses dérivés au Maghreb avec une moyenne de 110 L / personne/année, reste encore dépendante des entreprises étrangères du point de vue matière première et agent coagulant (Nouani et al., 2009), où le développement d'une production fromagère nationale basée sur des enzymes coagulants extraites à partir des sources locales, constitue le début du chemin de l'indépendance par la réduction des coûts d'importation.

Parmi ces succédanés, les protéases d'origine végétale sont très anciennement utilisées dans des préparations traditionnelles, telles que celles provenant du latex de plusieurs plantes tel que le figuier *Ficus carica L.*, qui est l'une des espèces fruitiers les

plus importantes dans le bassin méditerranéen, dont l'Algérie est parmi les pays producteurs de figues, en occupant la 3^{ème} place au niveau de la production mondiale, avec un patrimoine national, représenté par de nombreuses variétés, implantées sur des superficies montagneuses, d'où la pratique de l'utilisation ancestrale de latex pour la production du caillé du lait pour donner un fromage traditionnel appelée *Agugli* .

Dans ce contexte s'inscrit l'objectif de notre travail, de valoriser cette pratique ancestrale afin de vulgariser un succédané à base de figuier à la présure animale importé. 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 méthode et discussion des résultats.

Dans de la partie bibliographie, un aspect générale est donné pour les trois principaux volets ; le fromage, la coagulation du lait et la ficine.

Au cours de la partie pratique, la collecte des matières premières (latex de figuier), extraction et caractérisation de la ficine et comparaison avec la présure, la formulation du fromage et comparaison par une analyses physico-chimique et par une analyse sensorielle, ainsi que la présentation des différents résultats obtenus et leurs discussion, été détaillé.

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

Synthèse bibliographique

I. Fromage

I.1. Généralités

La preuve de fabrication du fromage remonte à 2800 ans avant notre ère, mais la découverte du fromage, aurait été un heureux accident. Tout lait laissé au chaud, ou stocké dans un sac fabriqué à partir de l'estomac d'un animal aurait fait en sorte que les matières solides du lait (le caillé) et le liquide (le petit-lait) se coagulent et se séparent permettant aux humains d'apprendre que leur produit le plus précieux, le lait, pourrait être conservé sous la forme de fromage et, éventuellement, que la présure, une enzyme trouvée dans l'estomac de l'animal producteur de lait, était le coagulant. Maintenant, quelque 5 000 ans plus tard, le fromage est fabriqué par tout le monde avec toutes sortes de laits.

Bien que le lait soit pratiquement le même partout dans le monde, la diversité des textures, des goûts et des arômes de fromage est presque infini, et pratiquement n'importe quel fromage peut être fabriqué partout dans le monde. Les nuances de la texture et du goût sont, quant à elles, déterminées par la matière première : le type et la race de l'animal, le sol, le pâturage, le climat, le microclimat et le savoir-faire du fromage ([Harbutt, 2009](#)).

I.2. Fromage frais

Selon la norme du Codex alimentarius (norme CODEX STAN 221 – 2001 pour les fromages non affinés y compris les fromages frais) et la norme internationale FAO/OMS A-6 (1978, modifiée en 1990), le fromage frais ou non affiné est un fromage qui est prêt à la consommation peu de temps après fabrication. Aux termes de la réglementation française (décret du 30 décembre 1988, ayant abrogé et remplacé le décret du 26 octobre 1953), la dénomination « fromage » est réservée à un produit fermenté ou non, obtenu par coagulation du lait, de la crème ou de leur mélange, suivie d'égouttage. Tous les fromages frais ont une DLC de 24 jours.

I.3. Enzymes coagulantes utilisées en technologie fromagère

Les enzymes coagulantes sont des enzymes protéolytiques retrouvées chez tous les organismes vivants. Ce sont des endopeptidases appartenant à la famille des protéinases aspartiques car elles possèdent deux résidus aspartyls dans le site actif impliqués de manière décisive dans la catalyse ([Rawlings et al., 2004](#)).

Elles sont utilisées depuis très longtemps dans la fabrication du fromage. En 1874, Hansen, un pharmacien danois, commercialise la première présure qui est une préparation

coagulante extraite de l'abomasum de veau non sevré et renfermant deux enzymes actives : la chymosine (80%) et la pepsine (20%). Cet extrait est depuis standardisé et utilisé directement par l'industrie laitière.

Actuellement, la présure de veau est la plus largement utilisée en fromagerie (Mahaut *et al.*, 2000). Toutefois, elle couvre seulement 20 à 30% de la demande mondiale en coagulants (Jacob *et al.*, 2011). De nombreux substituts d'origines animale, végétale, microbienne ou génétique (chymosine) ont été proposés, mais seuls quelques-uns se sont révélés aptes à une production fromagère de haute qualité.

En effet, les enzymes coagulantes de remplacement doivent répondre à un certain nombre de conditions :

- ✓ L'activité protéolytique doit être faible comparativement à l'activité coagulante ;
- ✓ La spécificité protéolytique sur la β -caséine doit être faible, sinon l'amertume se produit dans le fromage (Dalglish, 1992) ;
- ✓ La pureté chimique et la qualité microbiologique doivent être élevées ;
- ✓ Le rendement fromager devrait être identique à celui de la présure (Germonville, 2003).

Dans ce cadre, la chymosine fermentaire représente 70-80% du marché mondial des coagulants (Johnson and Lucey, 2006).

En France, les protéases d'origine animale et microbienne sont les plus utilisées en fromagerie (33% pour la présure ; 53% pour les enzymes microbiennes (35% pour *Mucor miehei* et 18% pour *Cryphonectria parasitica*)), la chymosine fermentaire représente seulement 14% (Isselnane, 2014). Aux Etats Unis d'Amérique et en Grande Bretagne, 80 à 90% des fromages sont produits par la chymosine fermentaire (Smyth, 2014).

I.3.1. Caractéristiques des enzymes coagulantes d'origine animale

L'extrait de caillette des mammifères contient des protéases gastriques responsables de la digestion des aliments. Elles sont classées en 4 groupes selon leurs propriétés enzymatiques et immunochimiques : la pepsine A (EC 3.4.23.1), la pepsine B (EC 3.4.23.2), la pepsine C ou gastricine (EC 3.4.23.3) et la chymosine (EC 3.4.23.4) (Foltmann *et al.*, 1981; Tang *et al.*, 1973). La pepsine A et la pepsine B sont dominantes et caractérisent la sécrétion stomacale du mammifère adulte, tandis que la chymosine est dominante chez les animaux non sevrés (Foltmann *et al.*, 1981; Tang *et al.*, 1973).

➤ **La pepsine**

La pepsine a un caractère plus acide que la chymosine avec un optimum compris entre pH 1,5 et 2. Elle reste stable, et toujours très active, lorsque le pH descend à 1,0. L'activité chute rapidement au-dessus de pH 6,3 et devient irréversiblement inactive à un pH d'environ 7 (Foltmann *et al.*, 1992).

➤ **La chymosine**

La chymosine (EC 3.4.23.4), est une enzyme néonatale possédant une forte activité coagulante. Elle clive spécifiquement la caséine κ (Phe105-Met106) provoquant la coagulation du lait dans l'estomac des pré-ruminants (Foltmann *et al.*, 1992).

La chymosine est une protéine globulaire constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 323 acides aminés (35,6 kDa) (Foltmann *et al.*, 1992).

L'activité optimale de la chymosine bovine a lieu à pH 5,5 et à une température de 42°C. De ce fait, en fromagerie, les conditions de milieu sont ajustées à des valeurs plus ou moins éloignées de ces optimums (entre 30 et 35°C) de manière à moduler leur temps de coagulation tout en maintenant le milieu viable pour la flore lactique (Berridge, 1952).

I.3.2. Coagulants végétaux

Les coagulants végétaux ont été utilisés pendant des siècles dans la fabrication artisanale de fromages ovins et/ou caprins, principalement au Portugal, dans les régions frontalières de l'Espagne et les pays d'Afrique de l'Ouest Raposo and Domingos (2008); (Roseiro *et al.*, 2003). On retrouve la papaïne (feuilles de papaye), la broméline (tige de l'ananas) et la ficine (suc du figuier) (Cattaneo *et al.*, 1994). Ces protéases sont caractérisées par une activité coagulante assez forte mais leur utilisation industrielle est limitée par leur fort pouvoir protéolytique (Claverie-Martín and Vega-Hernández, 2007).

I.3.3. Coagulants microbiens

Beaucoup de protéases extracellulaires d'origine microbienne agissent de façon similaire que la chymosine et sont, en partie, adaptées à la production de fromage (Robinson and Wilbey, 1998). Ces coagulants peuvent être facilement produits par fermentation. Toutefois, ils montrent une forte activité protéolytique pendant la fabrication du fromage, ce qui peut entraîner une perte de protéines, un rendement plus faible, et la génération d'une saveur désagréable (Harboe *et al.*, 2010).

La grande stabilité thermique a été l'inconvénient majeur de la première génération des protéases fongiques.

I.3.4. Chymosine produite par génie génétique :

Les méthodes modernes du génie génétique ont permis de cloner le gène de la chymosine bovine (variante B) sur certains micro-organismes tel que *Escherichia coli K12* (Emtage et al., 1983), *Saccharomyces cerevisiae* (Mellor et al., 1983), et *Aspergillus Niger var. awamori* (Cullen et al., 1987).

La chymosine recombinante est absolument identique en séquence d'acides aminés, poids moléculaire, propriétés enzymatiques et propriétés immunologiques à la chymosine de veau (Germonville, 2003). Elle est totalement exempte de la souche de production et elle ne contient pas d'ADN recombinant (Germonville, 2003; Harboe et al., 2010).

La chymosine produite par fermentation est pratiquement impossible à distinguer de la chymosine d'origine animale (Mohanty et al., 1999). De plus, elle présente de nombreux avantages :

- ✓ Elle a une faible activité protéolytique en raison de l'absence de pepsine ;
- ✓ Elle a une activité coagulante plus prévisible ;
- ✓ Elle est adaptée aux régimes végétariens ;
- ✓ Elle a acquis l'appui de certaines autorités religieuses (certifiées halal et autres) (Kumar et al., 2010).

II. Coagulation du lait

II.1. Définition

La coagulation du lait est une étape importante dans la préparation du fromage. Il s'agit de la transformation du lait liquide en un gel, appelé aussi coagulum ou caillé. On distingue deux types de coagulations : la coagulation acide et la coagulation enzymatique. Cependant, en fromagerie, la coagulation du lait résulte le plus souvent de l'action combinée d'une enzyme et de l'acidification, seule varie l'importance relative de leur action coagulante respective. Les mécanismes d'action de ces deux agents coagulants au niveau de la micelle sont très différents. Bien qu'ils conduisent tous deux à la formation d'un coagulum (gel ou caillé), les propriétés rhéologiques de ce dernier restent caractéristiques du mode de coagulation (Farkye, 2004; Janhøj and Qvist, 2010).

II.2. Mécanismes de la coagulation

II.2.1. Substrat spécifique intervenant dans la coagulation

Le substrat spécifique intéressé par le phénomène de coagulation dans le lait est constitué par les protéines, essentiellement représentées par les caséines. Ces dernières sont des phosphoprotéines qui représentent entre 52 et 87% des protéines totales du lait camelin (Al Kanhal, 2010), 80% des protéines totales du lait bovin, ovin, caprin, et seulement 40% du lait humain (Hipp et al., 1952; Mehaia et al., 1995). Il existe quatre différents types de molécules de caséine, α S1, α S2, β , et κ .

Dans le lait, les caséines sont présentes sous la forme de particules colloïdales nommées micelles de caséine. La structure exacte de la micelle de caséine fait encore l'objet de spéculations. Il existe plusieurs modèles de micelles de caséines dont le plus répandu est le modèle avec sous-unités de Schmidt (1982).

II.2.2. Coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique (pHi=4,6) par acidification biologique à l'aide de bactéries productrices d'acide lactique (bactéries lactiques contaminant à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levains) ou par acidification chimique (injection de CO₂ ou addition de gluconodelta lactone) (Mahaut et al., 2000).

Le gel formé présente une perméabilité satisfaisante, mais une friabilité élevée avec une élasticité et plasticité pratiquement nulles dues au manque de structuration du réseau. Les liaisons sont de faibles énergies de type hydrophobe et résistent peu aux traitements mécaniques (Mahaut et al., 2000).

II.2.3. Coagulation enzymatique

La présure est le coagulant le plus utilisé pour réaliser la coagulation du lait (Mahaut et al., 2000). Son mécanisme d'action est assez bien établi et comporte trois phases (Walstra and Jenness, 1984).

Une phase primaire ou enzymatique, au cours de laquelle la CN- κ est hydrolysée spécifiquement (Phe105-Met106) (figure 1), générant le fragment 1-105 ou paracaséine κ (hydrophobe) et le fragment 106-169 ou caséinomacropéptide (CMP) (hydrophile) (Tunick, 2008).

La paracaséine- κ liée aux caséines α et β reste intégrée à la micelle hydrophobe et le CMP contenant tous les glucides est libéré dans le lactosérum, ce qui entraîne une réduction de la charge négative et leurs degrés d'hydratation (Li and Dalgleish, 2006).

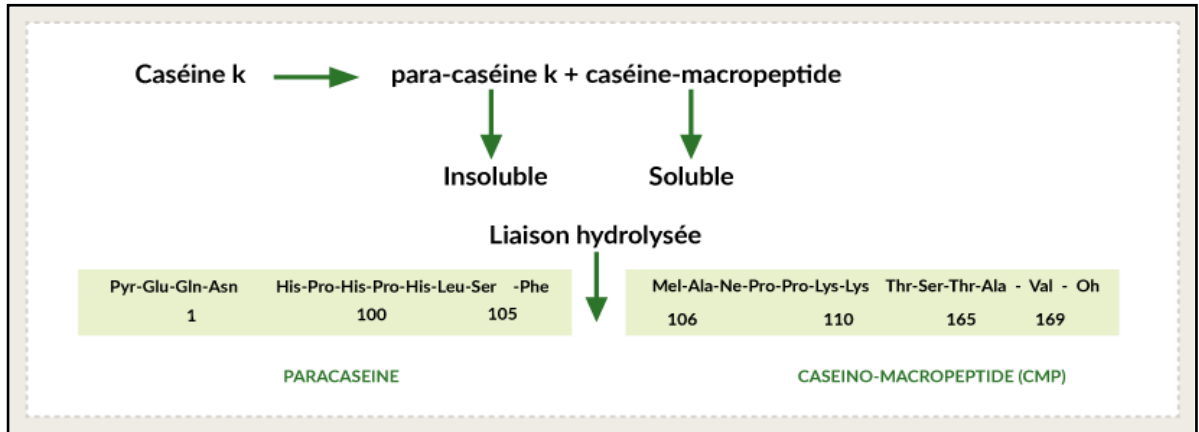


Figure 01 : Hydrolyse de la caséine κ par la présure.

Une phase secondaire qui correspond à la coagulation proprement dite. Elle commence lorsque, à pH 6,6, 80 à 90% de la CN- κ est hydrolysée (Mahaut et al., 2000). Les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes (Walstra and Jenness, 1984). Ces dernières s'agrègent en présence des ions de calcium libres. Au début, il y a une formation de chaînes linaires de micelles qui continuent de s'agréger pour former des amas. Ces derniers constituent le gel protéique qui se sépare nettement de lactosérum (Lucey, 2002).

A ces deux phases s'ajoutent une phase tertiaire ou phase de formation du gel qui se traduit par une lente protéolyse de toutes les caséines, suivie de la synérèse du coagulum qui s'accompagne de la rétraction et de l'expulsion du lactosérum (Brulé et al., 1997).

La coagulation enzymatique est influencée par plusieurs paramètres à savoir la température, le potentiel hydrogène, la concentration en CaCl_2 du lait utilisé, ainsi que la concentration et la nature de l'enzyme utilisée (Balcones et al., 1996; Dybowska and Fujio, 1996; Montilla et al., 1995; Nájera et al., 2003; Solorza and Bell, 1998).

III La ficine

III-1 Généralités sur le figuier

Le figuier dont le nom botanique est *Ficus carica* L. a un qualificatif générique qui signifie verrue pour *Ficus* (le lait de figuier pour soigner la verrue) et *carica* signifie originaire de la Carie, ancienne province d'Asie mineure (Turquie actuellement) (Dehgan, 1998).

Selon Vidaud (1987), le figuier serait originaire du bassin méditerranéen et du moyen orient, plus exactement d'Afghanistan. Son aire de répartition s'étend depuis les îles des Canaries jusqu'en Inde et au Pakistan, sur les côtes de l'Océan Atlantique comme sur toutes celles de la Méditerranée et dans le Moyen-Orient.

Il appartient à la famille des Moracées dont la spécificité est celle de contenir du latex.

Il existe plus de 1800 espèces de *Ficus* et plus de 800 types de *Ficus carica* (Pourmorad et al., 2011).

III-1.1 Classification botanique du figuier

Du point de vue systématique, la classification botanique du figuier comme décrite par Gaussen (1982) ; Joseph and Raj (2011) est la suivante :

Embranchement : Phanérogames

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Hamamélidées

Série : Apétales unisexuées

Ordre : Urticales

Famille : Moraceae

Genre : *Ficus*

Espèce : *Ficus carica* L.

III-2 Localisation du système enzymatique dans le végétal

Il est connu depuis bien des années que le latex de genre *Ficus* possède une activité protéolytique. Le nom ficine a été inventé par Robbins (1930) pour la poudre blanche purifiée dotée d'une activité antihelminthique obtenue à partir de latex de genre *Ficus* (Singleton and Buttle, 2013). Au fait, c'est en 1992 que l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire a recommandé le nom ficaine pour la « composante majeure protéolytique du latex du figuier ».

Toutes les parties de l'arbre du genre *Ficus* contiennent du latex (figure n°2), il assure une protection et une autoréparation contre les agressions physiques (Lansky et al., 2008). Il est constitué d'un fluide cytoplasmique contenant les organites habituels des cellules végétales, telles que les noyaux, les mitochondries, les vacuoles, les ribosomes et d'autres (Kim et al., 2008).

Le latex est une suspension aqueuse de couleur blanche, largement distribué dans la plante (Kim et al., 2008). Il contient divers métabolites secondaires comme les composés phénoliques et des protéines à savoir les protéases à cystéine (Agrawal and Konno, 2009). Le latex est constitué de caoutchouc, résine, albumine, sucre et acide malique, enzymes protéolytiques, diastase, estérase, lipase, catalase, et peroxydase (Joseph and Raj, 2011).

Par incision du tronc on recueille le latex qui coagule rapidement : filtré puis desséché, il constitue la ficine brute. Elle peut être utilisée par l'industrie agroalimentaire (attendrissement des viandes, coagulation du lait), dans l'industrie textile, en pharmacologie, en cosmétologie et en immuno-hématologie pour la recherche d'anticorps irréguliers (Jean, 2009). Traditionnellement, il est utilisé dans le traitement de la goutte, des ulcères et des verrues (Lansky et al., 2008).



Figure 02: Photographie représentative du latex de *Ficus carica*

III-3 Caractérisation et mécanisme d'action de la Ficine

La ficine ou ficaine (EC 3.4.22.3) est une endopeptidase à cystéine (Low, 1976; Nassar and Newbury, 1987; Grzonka *et al.*, 2007; Nouani *et al.*, 2009; Devaraj *et al.*, 2008; Azarkan *et al.*, 2011; Zar *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014). Les informations disponibles indiquent que la ficine a beaucoup de propriétés communes avec la papaine (Devaraj *et al.*, 2011).

La ficine est une protéine qui compte 210 acides aminés pour un poids moléculaire compris entre 20 et 35 KDa (Devaraj *et al.*, 2008, 2011).

Tarté (2009) a estimé que sa masse moléculaire est comprise entre 25 et 26 KDa. Lowe (1976) et Katsaros *et al.* (2009) ont évalués son poids moléculaire à 25 KDa. Son site actif est constitué de deux acides aminés qui sont la cystéine (Cys-25) et l'histidine (His-159)(Feijoo-Siota and Villa, 2011; Katsaros *et al.*, 2009). C'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.

Les protéases à cystéine, sont aussi connues comme des protéases à thiol, le mécanisme catalytique de ces enzymes implique un groupe de cystéine dans le site actif (Gonzalez-Rabade *et al.*, 2011).

La ficine est une protéase à cystéine avec une large spécificité d'hydrolyse des liaisons contenant des acides aminés non chargés, aromatiques et / ou hydrophobes (Di Pierro *et al.*, 2014). La ficine intervient sur la protéine au niveau de résidus d'acide aminé Tyrosine, Phénylalanine et Valine (Tarté, 2009; van Oort and Whitehurst, 2010).

Le clivage de la liaison Phe105-Met106 de k-caséine par la ficine est similaire à celui de la chymosine. D'autre part, la ficine manifeste une activité protéolytique excessive due à l'action non spécifique envers les autres caséines (α et β)(Walstra, 1999).

Par conséquent, le temps de coagulation diminue et mène à la formation des peptides amers, à l'affaiblissement de concentration du lait caillé et à la dissociation du caillot, ce qui affaiblit le rendement du lait caillé (Akar and Fadiloglu, 1999 ; Tarté, 2009).

Matériel & Méthodes

I. Matériel enzymatique

I.1. Collecte et préparation de l'extrait enzymatique de la Ficine

L'extrait enzymatique de la *Ficine*, qui est le liquide blanc visqueux qui s'échappe des feuilles et des fruits, une fois séparés des tiges, est récupéré à partir du latex du figuier *Ficus carica*.

Le latex a été collecté dans des flacons de 50mL, par incision manuelle de pédoncule du fruit vert immature et des feuilles, de la branche principale (Figure 03). Cette opération est effectuée au même stade de maturation, dans les alentours du village de Sidi aich (Bejaïa), durant le mois de juillet 2018.

Le latex, ainsi frais, à été transporté au laboratoire dans une glacière et immédiatement reparti dans des tubes.

Après centrifugation à 5000tr /min pendant 15 min à (+4 °C), trois phases sont récupérées. La phase superficielle représente les gommés, et la phase inférieure représente les débris, alors que l'extrait de ficine, est récupéré dans la phase du milieu (Gagaoua et al., 2014).

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

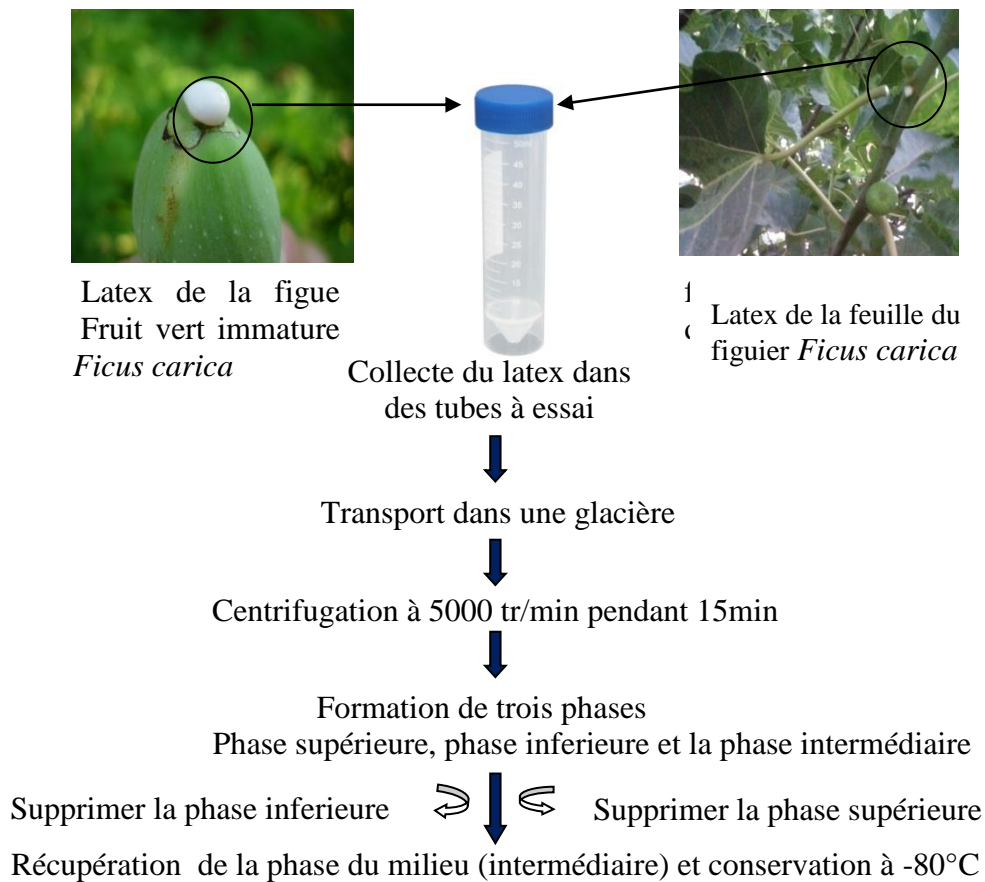


Figure 03 : Diagramme d'extraction de l'extrait brut de la ficine.

I.2. Préparation de l'extrait enzymatique de présure

L'extrait enzymatique de présure utilisé dans la présente étude, est préparé à partir d'une poudre d'enzyme lyophilisée (100% chymosine). Cette poudre est utilisée dans la laiterie SOUMMAM (annexe I) pour la fabrication du fromage, en additionnant 1,3g de présure à 10ml d'eau distillée stérile. Pour activer cette préparation enzymatique, 1,25g de NaCl sont ajoutés.

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

II.1. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques

Le dosage des protéines totales dans les extraits enzymatiques est déterminé selon la méthode de [Bradford, \(1976\)](#).

La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique dont le principe repose sur l'adsorption 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 présentes dans l'échantillon.

Pour 500 µL de chaque extrait enzymatique, 2mL 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 595nm.

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

II.2. Mesure des activités enzymatiques

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

II.2.1. Détermination de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée selon la méthode décrite par [Green and Stackpole \(1975\)](#), Cette mesure permet d'évaluer le taux de dégradation du substrat

(caséine) par l'enzyme pendant la phase primaire (phase enzymatique). Pour cela, nous avons mesuré la concentration des produits d'hydrolyse de la caséine, solubles dans l'acide trichloracétique (TCA) à 12 % concentration finale.

En effet, l'activité protéolytique de nos extraits enzymatiques est 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 et al. \(1951\)](#).

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

Une unité de protéase (U) correspond à l'équivalent de 1 µg de tyrosine libérée en une heure de digestion par 1 ml d'extrait enzymatique, avec comme substrat, soit la caséine, soit l'hémoglobine ([Mechakra et al., 1999](#)).

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

Un volume de 1ml 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 35 °C pendant 20 minutes, et la réaction est arrêtée par l'addition de 5 mL de TCA à 5% et laissée au repos pendant 15 minutes à température ambiante.

L'ensemble est alors centrifugé, et 0.5 mL du 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 (Na₂ CO₃) dans 250 mL d'eau distillée.

La solution B est préparée en mélangeant 0.1 g de tartrate sodium-potassium (C₄ H₄ KNaO₆) et 0.032g de sulfate de cuivre CuSO₄ dans 10 mL d'eau distillée.

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

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 III).

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

A partir de l'activité protéolytique, une activité spécifique, exprimée en U/mg , est calculée. Elle est définie comme étant le rapport entre l'activité enzymatique et la teneur en protéines de l'extrait enzymatique.

$$\text{Activité spécifique} = \text{activité enzymatique (U)} / \text{teneur en protéines (mg)}.$$

II.2.2. 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 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 ([Alais, 1984](#); [Ramet, 1997](#)).

Le substrat de Berridge est préparé par l'addition de 12 mg de lait écrémé à 100ml de solution de CaCl_2 (0.01M). Après 30 minutes d'agitation lente, le pH est ajusté à 6.4 .

Afin de mesurer l'activité coagulante à 35°C , ce substrat est chauffé au bain marie jusqu'à la température voulue. Un volume de 5ml de ce substrat (35°C) est additionnés de $500\mu\text{L}$ l'extrait enzymatique.

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

$$\text{U.A.C} = \frac{100 \cdot V}{10 \cdot t \cdot v}$$

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 (100 secondes).

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), donnée en unité Soxhlet (US). Elle représente le nombre de volumes de lait frais coagulé par un volume d'extrait coagulant, pendant un temps de 40min à 35°C (Alais, 1984; Benyahia-Krid *et al.*, 2010; Schuck *et al.*, 2000).

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

$$F = \frac{2400 * V}{T * v}$$

Avec :

V: volume de lait ;

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

T : temps de coagulation en secondes ;

2400 : temps d'incubation (40min) x 60 secondes.

III. Etude des paramètres influençant l'activité enzymatique

III.1. Effet de la température sur l'activité coagulante.

L'influence de la température sur l'activité coagulante est étudiée en mesurant l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de la ficine et la présure, à différentes températures et en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique. Le substrat est préparé dans les mêmes conditions, à savoir une concentration en CaCl₂ de 0.01M, et un pH = 6.4.

Les températures du lait choisies sont : 35°C,40°C,45°C,50°C,55°C,60°C,65°C,70°C pour l'extrait enzymatique brut de la ficine, et de 28°C,30°C,35°C,37°C,40°C pour la solution de présure.

III.2. Effet du pH sur l'activité coagulante.

L'influence du potentiel hydrogène (pH) du lait sur l'activité coagulante est étudiée en mesurant l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de la ficine et la présure à température optimale pour chaque extraits enzymatiques, mais à différents pH, en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique. Le substrat de Berridge est préparé dans les mêmes conditions, à savoir une concentration en CaCl₂ de 0.01M.

Le pH du lait a été ajusté pour les valeurs de : 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 ; 8 pour l'extrait enzymatique brut de la ficine, et de 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 pour la solution de présure, par l'addition des solutions de HCl (0,1N) ou de NaOH (0,1N).

La température du lait est ramenée à 60°C pour l'extrait enzymatique brut de la ficine et 37°C pour la présure 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 de caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne du tube incliné subissant un lent mouvement de rotation.

III.3. Effet de la concentration de chlorure de calcium sur l'activité coagulante.

L'influence de la concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques (la ficine et la présure) est étudiée à 35°C et à pH=6.5, en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique, préparé avec différentes concentrations en CaCl_2 ; 0,005M, 0,01M, 0,02M, 0,03M, 0,04M et 0,05M.

Le temps de floculation est mesuré pour chaque concentration, et correspond au temps s'écoulant entre l'addition de l'extrait enzymatique au de substrat de Berridge, à la concentration en CaCl_2 donnée, et de l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne du tube incliné, subissant un lent mouvement rotationnel.

III.4. Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique

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

IV. Etude comparative entre deux fromages frais élaborés par chaque extrait enzymatique.

IV.1. Analyses physico-chimiques de la poudre de lait

La détermination des paramètres physico-chimiques est réalisée au niveau du laboratoire de la laiterie SOUMMAM, selon les protocoles établis par l'international standard organisation **I.S.O 9001** de l'année 2015.

IV.1.1. Détermination du potentiel d'hydrogène (pH)

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

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.

IV.1.2. Détermination du taux d'humidité

La détermination du taux d'humidité consiste à tarer le poids de la coupelle en aluminium déposée sur la balance, qui se trouve à l'intérieur de la chambre chaude du dessiccateur. Par la suite, une prise d'essai d'environ 4g de la poudre de lait est déposée à la surface de la coupelle. L'appareil est fonctionnel, par appui sur la touche START, le chauffage de la prise d'essai sera lancé jusqu'à l'évaporation totale de son eau libre, et le taux d'humidité est directement affiché, en pourcentage sur l'écran du dessiccateur.

IV.1.3. Détermination de l'acidité

L'acidité de la poudre de lait est déterminée par titrimétrie, 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.

IV.1.4. Détermination de la teneur en matière grasse

La détermination est basée sur l'ajout de l'acide sulfurique qui dissout les protéines du lait. La séparation de la matière grasse des autres constituants est réalisée après centrifugation du butyromètre en présence de l'alcool iso-amylque.

La technique consiste à mettre dans le butyromètre, un volume de 10ml d'acide sulfurique, qui sera par suite additionné d'un volume de 11ml d'eau distillée, de 2.5g de poudre de lait et d'un volume de 1ml d'alcool amylique. L'ensemble est bien homogénéisé, et centrifugé pendant 5minutes à 1200 tr/min.

Le taux de matière grasse, exprimée en pourcentage, est déterminé directement sur le butyromètre tenu verticalement selon la formule suivante :

$$MG(\%)=N_1-N_2$$

Où N_1 : valeur atteinte par le niveau supérieur de la colonne

N_2 : valeur atteinte par le niveau inférieur de la colonne.

IV.1.5. Détermination de la teneur en protéines :

- **Principe de mesure de l'interféromètre FTIR**

La détermination du taux de protéines s'effectue à l'aide d'un milkoscan FT1 (Annexe IV), qui est un spectrophotomètre à FTIR (Fourier Transform InfraRed Spectroscopy) automatique de grande capacité (120 échantillons analysés par heure). Il utilise la technologie d'absorption spectroscopique en moyen infrarouge à transformée de Fourier (Capacité : 3-10 μm correspondante à 1000– 5000 cm^{-1}).

L'interféromètre FTIR balaye le spectre complet du moyen infrarouge, fournissant des absorbances sur un nombre de longueurs d'ondes illimité. Les résultats sont fournis en simultané à partir du spectre complet ce qui permet de mesurer de nouveaux paramètres, et ce, même lorsqu'il s'agit d'analyser des produits laitiers complexes.

L'analyse des paramètres supplémentaires devient simplement une question de calibrage. Une fois les faisceaux divisés par le miroir semi-réfléchissant, l'appareil envoie une partie des rayons sur un miroir fixe et l'autre partie sur un miroir mobile (annexe IV).

A partir des miroirs, les rayons se réfléchissent et se recombinent avant d'atteindre le détecteur.

Toutes les fréquences infrarouges passent au même moment dans l'interféromètre. Le miroir effectue de rapides et petits mouvements, ce qui permet de balayer le spectre moyen infrarouge. Le laser envoie une lumière monochromatique qui est utilisée pour déterminer avec précision la position du balayage des longueurs d'ondes.

En un laps de temps court, l'interféro-gramme est recueilli par le spectromètre, traité par le calcul de transformation de Fourier et est converti en un spectre entier de l'échantillon.

A partir de ce stade, on retrouve à nouveau la théorie générale de la spectrométrie, de l'intensité de la lumière, de l'absorption et leurs relations avec les paramètres composants un échantillon spécifique.

De ce principe, cet appareil permet en une seule analyse et pour une prise d'essai donnée (poudre de lait dissoute dans l'eau potable traitée) d'effectuer plusieurs paramètres, à savoir, le taux de protéine, la teneur en matière grasse, le taux de lactose, l'extrait sec total, l'extrait sec dégraissé, et la densité du lait.

Le résultat est directement affiché en pourcentage sur l'écran de l'interféromètre FTIR.

IV.2. Elaboration de fromage frais par l'extrait enzymatique de la ficine et de la présure

Afin de compléter l'étude comparative entre les deux extraits enzymatiques, ficine et présure, une comparaison entre deux fromages, élaborés en utilisant respectivement la ficine et la présure est jugée nécessaire.

Un fromage frais est préparé, selon le processus technologique de l'entreprise SOUMMAM avec quelques modifications.

L'entreprise SOUMMAM, fabrique du fromage frais à partir de la poudre du lait à 0% de matière grasse, appelée *low-heat*, qui sera utilisée dans notre étude comparative pour l'élaboration de deux fromages, ensemencé chacun par un extrait enzymatique soit la présure, soit la ficine.

Une quantité de 120g de cette poudre est utilisée pour la reconstitution d'un litre de lait. Une fois bien homogénéisé à l'aide d'un mixeur ménagère (figure 4), il est transvasé dans le récipient du thermo-mix (figure 5), l'équivalent d'un pasteurisateur à l'échelle du laboratoire pour être chauffé à 95°C pendant 5 minutes.



Figure 4 : Préparation du lait reconstitué



Figure 5 : Pasteurisation du lait

A la fin de cette opération, on plonge les récipients de lait dans un bain de glace, jusqu'à température optimale d'ensemencement pour chaque extrait enzymatique.

Le lait destiné pour l'ensemencement avec l'extrait de ficine est refroidi jusqu'à température de 60°C, alors que celui ensencé avec l'extrait de présure est refroidi jusqu'à 38°C.

L'ensemencement de chaque lait, est réalisé dans un bac, avec un volume de 160 μ L/L de ficine brute et 1,25 mL/L de solution de présure, respectivement. La coagulation a été réalisée dans une étuve thermostatée à 38°C et à 60°C pendant 30min, jusqu'à l'obtention du caillé, qui sera découpé à l'aide d'un couteau, et transvasé sur une toile pour l'égouttage (figure 6). Cette opération, est améliorée par une pression à la main de la toile.

Le caillé bien égoutté est mis dans des moules en plastique pour lui donner la forme voulue par l'entreprise (figure 7).

Le caillé de ficine est additionné de sel de NaCl à raison de 2,5%, afin de cacher l'amertume due à l'extrait de ficine.

Une étude comparative entre les deux fromages a été réalisée, et ceci en analysant les paramètres physicochimiques de chaque produit ainsi que le lactosérum pour déterminer le taux de pertes et les rendements (figure 8).

L'étude physico chimique est complétée, à la fin, par une analyse sensorielle.

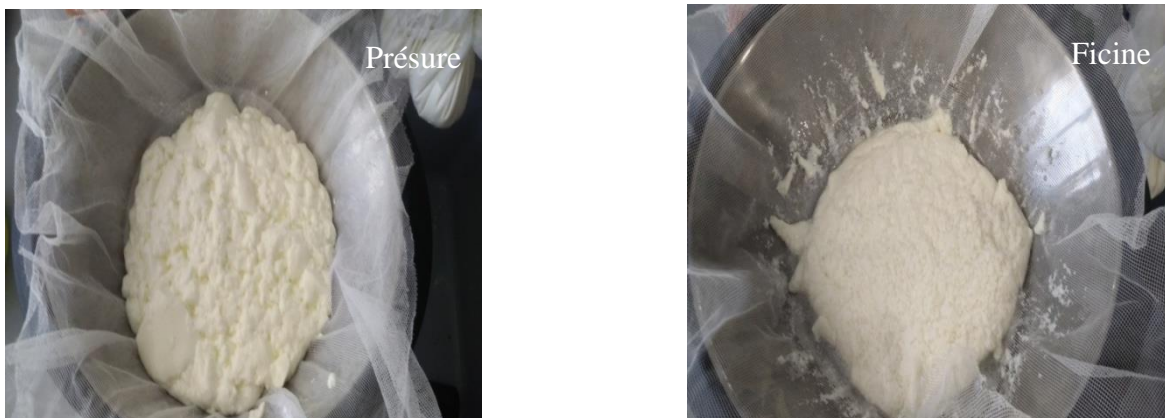


Figure 6 : Séparation du lactosérum et récupération du caillé



Figure 7 : Photographie des fromages Frais préparés avec la ficine et la présure

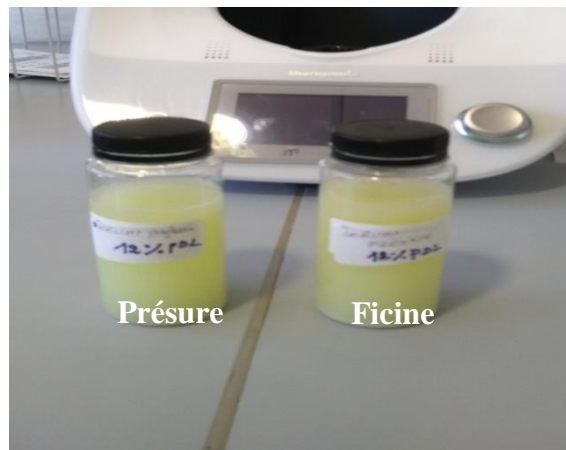


Figure 8 : Photographie des lactosérums obtenus

IV.3. Analyses physico-chimique du fromage et du lactosérum

IV.3.1. Mesure du pH

Le pH des fromages et des lactosérums, a été mesuré à 20°C, à l'aide d'un pH-mètre, étalonné à la même température.

IV.3.2. Mesure de l'acidité

L'acidité Dornic du fromage est réalisée selon la méthode décrite par l'ISO 2009 (2015), utilisée par l'entreprise SOUMMAM.

Dans un bécher contenant 10mL du produit, quelques gouttes de la phénolphtaléine sont ajoutées, et l'ensemble est titré avec une solution de NaOH, jusqu'au virage rose pâle facilement perceptible et persistant pendant 10 secondes.

Les résultats sont exprimés, en degrés Dornic (°D) où 1°D correspond à 0,1g/l d'acide lactique, exprimé par le volume de la chute de la burette en mL x 10.

IV.3.3. Détermination de l'extrait sec total

La détermination de l'extrait sec total du fromage consiste à tarer le poids de la coupelle en aluminium déposée sur la balance, qui se trouve à l'intérieur de la chambre chaude du dessiccateur. Par suite, une prise d'essai d'environ 4g du fromage est déposée à la surface de la coupelle. Une fois, l'appareil est fonctionnel, par appuis sur la touche START, le chauffage de la prise d'essai sera lancé jusqu'à l'évaporation totale de son eau libre, et le taux de l'extrait sec est directement affiché, en pourcentage sur l'écran de cet appareil.

La détermination de l'extrait sec total des lactosérums obtenus, s'effectue à l'aide d'un milkoscan FT1, qui est un spectrophotomètre à FTIR.

Cet appareil permet en une seule analyse et pour une prise d'essai donnée (lactosérum) d'effectuer plusieurs paramètres, à savoir, le taux de protéine, la teneur en matière grasse, le taux de lactose, l'extrait sec total, l'extrait sec dégraissé, et la densité du lait. Le résultat est directement affiché en pourcentage sur l'écran de l'interféromètre FTIR.

IV.3.4. Détermination du taux de protéines

La détermination du taux de protéine dans le lactosérum est effectuée dans le but de connaître le taux de pertes en protéines après l'opération de l'égouttage du caillé.

Le principe est le même que celui de la poudre de lait, l'analyse s'effectue à l'aide d'un milkoscan FT1, qui est un spectrophotomètre à FTIR, qui permet en une seule analyse et pour une prise d'essai donnée (lactosérum) d'effectuer l'analyse.

Le résultat est directement affiché en pourcentage sur l'écran de l'interféromètre.

IV.3.5 Détermination du taux de lactose

Afin de mesurer le taux de pertes en lactose, la détermination du taux de lactose dans le lactosérum est jugée nécessaire.

L'analyse se réalise à l'aide d'un milkoscan FT1, qui est un spectrophotomètre à FTIR, qui permet en une seule analyse et pour une prise d'essai donnée (lactosérum) d'effectuer l'analyse.

Le résultat est directement affiché en pourcentage sur l'écran de l'interféromètre FTIR.

V. Analyse sensorielle des fromages

La réalisation de l'analyse sensorielle a pour but de comparer entre les deux fromages, dont le premier est issu de la coagulation par la présure et le second en utilisant l'extrait brut de ficine, et également d'estimer le degré d'acceptabilité du nouveau produit par les consommateurs.

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 dont la majorité sont des jeunes de 20 à 30 ans.

Une présentation de deux types de fromages d'une portion de 10g est exposée de façon anonyme aux dégustateurs, dans un ordre spécifique de gauche à droite.

Résultats & Discussions

I. Caractéristiques des activités enzymatiques des extraits

L'extrait de la ficine obtenu est une solution visqueuse de couleur brune claire. Ces caractéristiques sont confirmées par les résultats de [Nouani et al. \(2009\)](#). Les résultats de la caractérisation des extraits enzymatique de ficine et de la présure, sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau I : Caractéristiques physicochimiques des extraits enzymatiques étudiés.

Paramètre	Extrait brut de la ficine	Présure
Teneur en protéine (mg/mL)	67.95±3.63	2.24±0.03
Activité protéolytique (µg/mL.h)	167.81±0.51	28.2±0.50
Activité protéolytique spécifique (µg/mg.h)	2.47	12.59
Activité coagulante (UP)	14.53±0.18	5.33±0.03
Force coagulante (F)	3487.2	1279.2
couleur	Brune claire	transparente

I.1. Teneur en protéine

Les résultats de la présente étude montrent que la teneur en protéine des extraits enzymatique étudiés varie de 2,24 à 67,95mg/ml. La teneur en protéine la plus élevée est retrouvée dans l'extrait brut de la ficine.

Les résultats obtenus sont légèrement différents de ceux rapportés par la bibliographie.

En effet, [Fadyloğlu \(2001\)](#) et [Williams et al. \(1968\)](#) ont retrouvés des taux de protéines du latex de la ficine de *Ficus carica* de l'ordre 116 mg/ml et 156 mg/ml, respectivement.

Elle est également inférieure à celle obtenue par [Devaraj et al. \(2008\)](#) pour la ficine extraite de latex de *Ficus racemosa* qui est de 156 mg/ml.

Ces différences peuvent être attribué a plusieurs paramètres entre autres au caractères variétales, les conduites agronomiques, aux variations saisonnières et le taux d'ensoleillement ([Durand, 1982](#)).

I.2. Activité protéolytique

L'activité protéolytique est basée sur l'estimation de la quantité des peptides simples et des acides aminés libres formés par l'hydrolyse d'une protéine sous l'action d'une protéase ou un mélange de protéases.

Les résultats (tableau I) de l'estimation de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques étudiés indiquent que l'activité protéolytique de l'extrait de ficine est six fois plus élevée que celle de la solution de présure. En effet, elle est estimée à $167,81 \pm 0,51$ $\mu\text{g/mL.h}$ pour l'extrait brut de ficine contre une valeur de $28,2 \pm 0,50$ $\mu\text{g/mL.h}$ pour la présure. Cette activité protéolytique excessive de la ficine a été signalée par plusieurs auteurs (Fadyloğlu, 2001; Lynn and Clevette-Radford, 1986; Öner and Akar, 1993); (Faccia et al., 2012; Nouani et al., 2009; Shah et al., 2014).

Selon l'étude de SIAR (2014) l'activité protéolytique des extraits de latex de *Ficus carica* est estimée à $469,7 \mu\text{g/ml.min}$.

La différence par rapport aux résultats retrouvés de la présente étude peuvent être attribué a plusieurs facteurs tels que le caractère variétale, les conduites agronomiques, cycle de croissance de la plante, etc (Durand, 1982).

Fox et al. (1998) 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).

Cette activité protéolytique non spécifique des protéases végétales vers les fractions des caséines α et β est responsable de l'amertume et le faible rendement fromager, ce qui limite leur utilisation dans la fabrication des fromages (Akar and Fadiloglu, 1999).

Les résultats du tableau I montrent que l'activité protéolytique spécifique de la présure estimée à $12,59 \mu\text{g/mg.h}$ de protéines est six fois supérieure à celle de l'extrait brut de la ficine estimée à $2,47 \mu\text{g/mg.h}$ de protéines.

L'activité protéolytique spécifique élevée de la présure est due à sa pureté élevée (100% chymosine), contrairement à l'extrait brut de la ficine qui contient des protéines enzymatiques autres que la ficine et également des protéines non enzymatiques.

I.3. Activité coagulante

Les résultats de la présente étude (tableau I) montrent que l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés varie de $5,33 \pm 0,03$ à $14,53 \pm 0,18$ UP. L'extrait enzymatique de la ficine présente l'activité la plus élevée par rapport à l'extrait de présure.

Selon les travaux de [Nouani et al. \(2009\)](#) et [Fadılođlu \(2001\)](#), l'activité coagulante de la ficine brute est de l'ordre de 1500 UP. [Williams et al. \(1968\)](#) ont rapporté des valeurs de 320 UP.

Cette différence, avec les résultats de la présente étude, peut être attribuée à plusieurs facteurs, comme le caractère variétal, le sol et les conduites agronomique et le climats, ainsi que le taux d'ensoleillement ([Durand, 1982](#)).

II. Détermination des conditions optimales de coagulation des extraits enzymatiques étudiés

II.1. Effet de la température sur l'activité de l'extrait brut de la ficine et la présure

Chaque enzyme possède une température optimale spécifique. Plus cette température baisse, plus le mouvement moléculaire sera réduit et plus la cinétique enzymatique sera lente et l'enzyme devient inactive ([Robitaille et al., 2012](#)).

En effet, lorsque la température du milieu augmente, les particules (molécules ou ions) sont plus agitées, ce qui favorise la rencontre des différents réactifs. Les molécules s'entrechoquent et libèrent de l'énergie, qui permet ensuite d'atteindre plus rapidement le palier de l'énergie d'activation nécessaire à la réaction. Dans ce cas, l'augmentation de la température a un effet positif sur la réaction, mais après une certaine activité thermique, elle diminue en raison de la dénaturation ([Bayraktar and Önal, 2013](#); [Kumar et al., 2012](#); [Özer et al., 2010](#)).

De ce fait, une étude de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatique étudiés a été réalisée. La variation de l'activité des extraits enzymatique est suivie en fonction de la température, de 35 à 70 °C pour l'extrait de ficine, et de 28 à 40°C pour l'extrait de présure.

Le choix de cette gamme de température pour la présure est basé sur les données bibliographiques reflétant la sensibilité de la présure vis-à-vis les températures au-delà 40°C ([Dybowska, 1996](#); [Eck, 1990](#)).

Les résultats obtenus, de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits de ficine et de présure sont représentés dans la figure n°9.

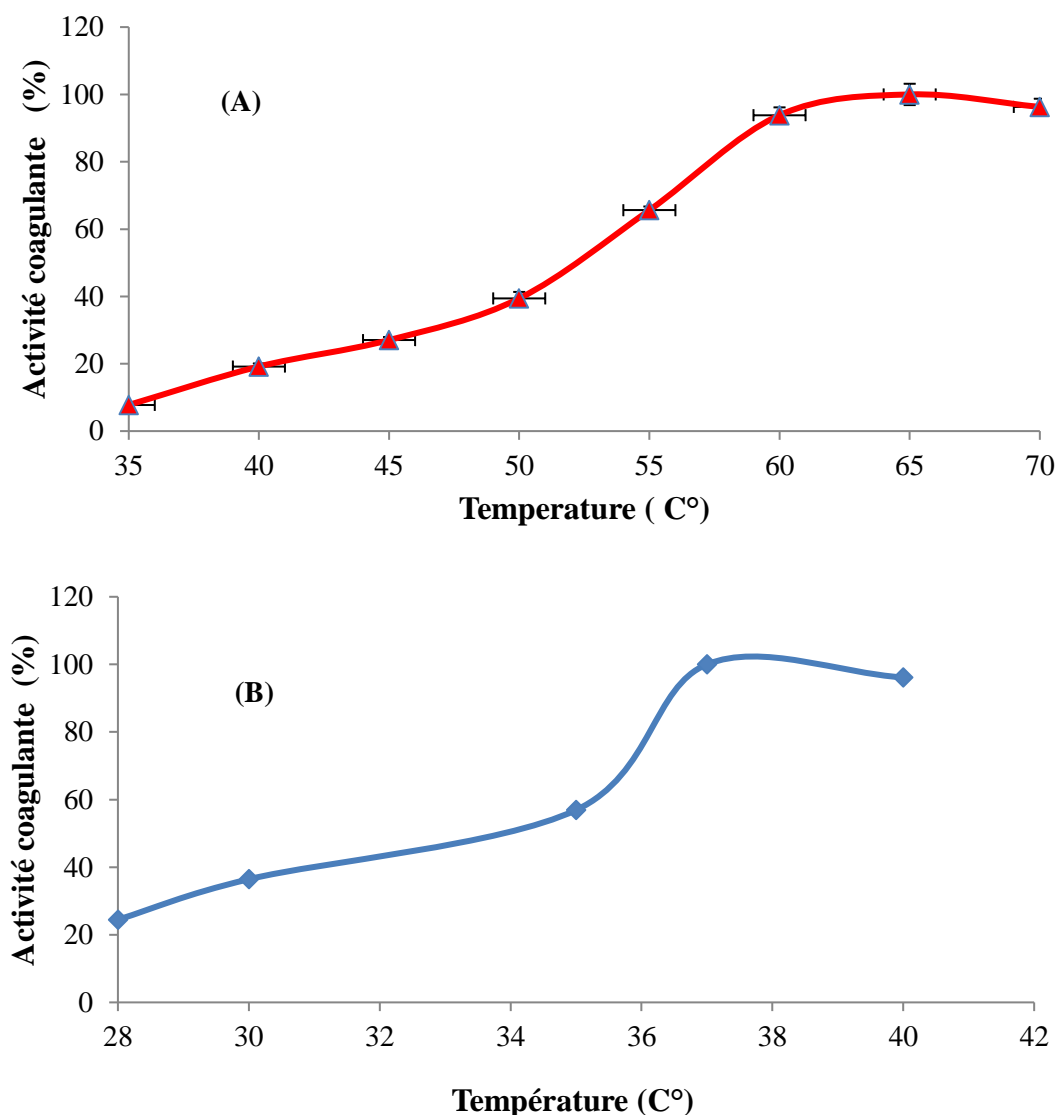


Figure 9: Représentation graphique de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

A : extrait enzymatique brut de ficine **B :** extrait enzymatique de présure.

Les résultats obtenus dans la présente étude, montrent que l'activité enzymatique de la ficine et de la présure est très influencée par la température. Cette activité augmente avec l'augmentation de la température, jusqu'à un certain seuil, puis elle décroît.

D'après les résultats obtenus également, l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine atteint la valeur maximale dans l'intervalle de température de 60°C à 65°C, et diminue au delà de 70°C. Ce résultat est très similaire à celui rapporté par plusieurs auteurs (Devaraj *et al.*, 2008; Sugiura and Sasaki, 1974), qui ont rapporté une activité enzymatique maximale de la ficine à l'intervalle de températures comprises entre 50 et 65°C.

Selon [Gagaoua et al. \(2014\)](#), la température optimale de la ficine de *Ficus carica* est de 60°C.

[Arribérre et al., \(2000\)](#), ont rapportés que la température optimale de la ficine de *Ficus pumila* est au voisinage de 60°C avec une activité décroissante à 75°C.

Cependant, [Yang et al. \(2017\)](#), ont retrouvés que la température optimale, pour une activité relative maximale de la ficine est de 35 °C avec un temps de réaction de deux heures .

D'après les résultats obtenus également, l'activité enzymatique de l'extrait de présure atteint la valeur maximale au voisinage de 37-38 °C.

Selon [Lucey \(2002\)](#), la température optimale pour la coagulation du lait par la présure est au voisinage de 45 °C, pour un lait à pH=6.6.

L'augmentation de la température du lait entraîne une amélioration très nette de l'activité coagulante des deux enzymes étudiés. Toutefois, cette amélioration est plus importante dans le cas de la ficine brute. ([Dybowska, 1996](#); [Horne and Banks, 2004](#)). 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, 2009](#).)

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

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.

En effet, l'acidité du milieu peut déformer la structure tertiaire d'une enzyme de façon plus ou moins importante. Cette déformation de l'enzyme modifie son action, et ne fonctionne plus normalement et sa vitesse catalytique est réduite ([Robitaille et al., 2012](#)).

L'effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine et de la présure a été étudié en ajustant le pH du lait (substrat de Berridge) aux valeurs de l'intervalle 6,0 à 8,0 pour l'extrait brut de la ficine et 5,5 à 7,0 pour la présure. La température d'incubation est fixée à 60 °C pour la ficine brute et à 37°C pour la présure.

Les résultats obtenus, de l'effet du pH sur l'activité coagulante de la ficine brute et de la présure sont représentés dans la figure n°10.

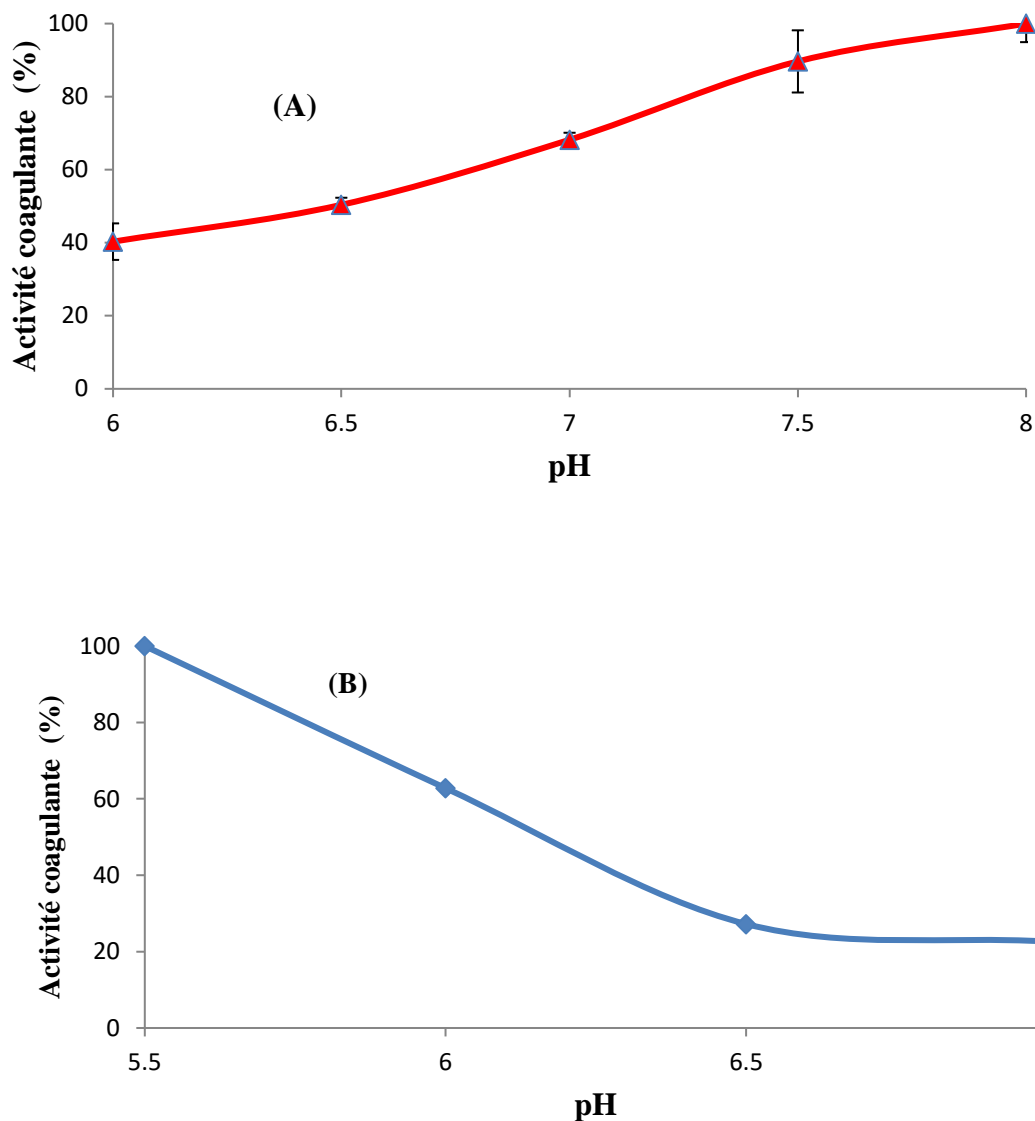


Figure 10: Représentation graphique de l'influence du pH sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

A : extrait enzymatique brut de ficine. **B :** extrait enzymatique de présure.

Les résultats obtenus montrent, que l'activité coagulante de l'extrait enzymatique de la présure, augmente au fur et à mesure de l'abaissement du pH du lait. L'activité la plus élevée est observée à pH= 5,5, et diminue de 80% à pH =7.

Plusieurs auteurs ont rapportés que le pH optimum de la présure est au voisinage de 5,1-5,3(Humme, 1972; Hyldig, 1993; Lopez et al., 1998; Van Hooydonk et al., 1986). Cependant, Kowalchuk and Olson (1977), ont reportés que la coagulation du lait n'est pas vraiment efficace à un pH inférieur à 5.

Les résultats obtenus montrent, également, que l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine, augmente progressivement avec l'augmentation du pH. Elle est de l'ordre de 40,3% à la valeur du pH 6, et atteint le 100% au voisinage du pH 8.

L'extrait brut de la ficine est plus actif dans le domaine neutre, que dans le domaine acide, ce qui est en accord avec les travaux de Devaraj et al. (2008), qui ont rapporté que l'enzyme est instable à pH acide et plus stable à pH neutre.

Des résultats similaires ont été déjà rapportés par Kramer and Whitaker (1964), montrant que les différentes formes de ficine de *Ficus carica* sont plus actives au gamme de pH neutre.

La ficine a une très faible activité à des niveaux de pH très acides (pH 3-6), parce que les groupes fonctionnels dans le site actif sont perturbés par les ions H⁺ excessifs.

Au valeurs de pH situées entre 7 et 9, l'activité enzymatique est maximale, parce que l'enzyme atteint le degré d'ionisation attendu, tandis qu'au pH de 10 à 12, l'activité enzymatique est réduite en raison d'un excès des ions OH⁻ (Hames and Hooper, 2004).

II.3. Effet de la concentration en chlorure de calcium sur l'activité de l'extrait brut de la ficine et la présure

L'addition du chlorure de calcium au lait, réduit son pH, qui se traduit par l'augmentation du taux d'agrégation des protéines (Flüeler and Puhan, 1978; Gastaldi et al., 1994)

L'effet de la concentration du CaCl₂ du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine et de la présure à été étudié en variant la concentration en CaCl₂ du lait (substrat de Berridge) aux valeurs de 0,005 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 et 0,05M pour l'extrait brut de la ficine et de la présure.

Les résultats obtenus par de l'effet de la concentration de CaCl₂, sur l'activité coagulante de la ficine brute et de la présure sont représentés dans la figure n°11.

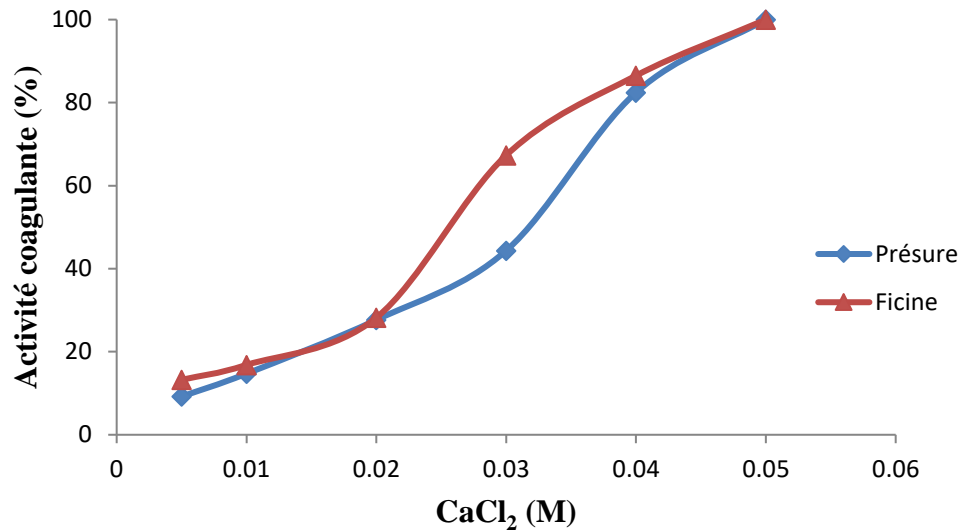


Figure 11 : Représentation graphique de l'influence de la concentration en CaCl_2 sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

Les résultats obtenus dans la présente étude, montrent que l'activité coagulante des deux extraits augmente avec l'augmentation de la concentration du CaCl_2 , dont l'activité, la plus élevée est observée à la concentration de 0,05M pour les deux extraits enzymatiques étudiés.

En accord avec (Balcones *et al.*, 1996; Montilla *et al.*, 1995; Storry *et al.*, 1983; Tervala *et al.*, 1986), l'addition de Ca^{+2} , réduit le temps de la coagulation du lait présuré, mais à des concentrations en CaCl_2 supérieures ou égales à 0,3M, le temps de coagulation peut augmenter (McMahon *et al.*, 1984; Patel and Reuter, 1986).

Pour les concentrations élevées, l'activité coagulante baisse par un effet inhibiteur de l'ion calcium. Ceci s'explique par l'inhibition des caséines du lait (Cheftel *et al.*, 1977).

Selon Daviau *et al.* (2000), le calcium a des effets opposés en fonction de la concentration de pH. Lorsque le lait contient environ de 18mM de CaCl_2 , une augmentation du taux de formation du gel et de sa fermeté à pH élevé (au voisinage de 6,8) est observée mais l'opposé se produit à pH faible(6). Ce résultat confirme que l'effet du calcium sur le taux de raffermissement du gel est fortement dépendant de pH. Ceci est en accord avec les résultats trouvés par d'autres auteurs (Daviau *et al.*, 2000; Nájera *et al.*, 2003), indiquant que les interactions électrostatiques ainsi que les répulsions stériques jouent un rôle complémentaire dans la déstabilisation du système micellaire.

II.4. Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique des extraits bruts de la ficine et la présure

L'effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité enzymatique protéolytique des extraits enzymatiques étudiés est déterminé par la mesure de l'activité enzymatique à différentes concentrations de l'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 enzymatique de la ficine brute et de la présure, sont représentés dans la figure n°12.

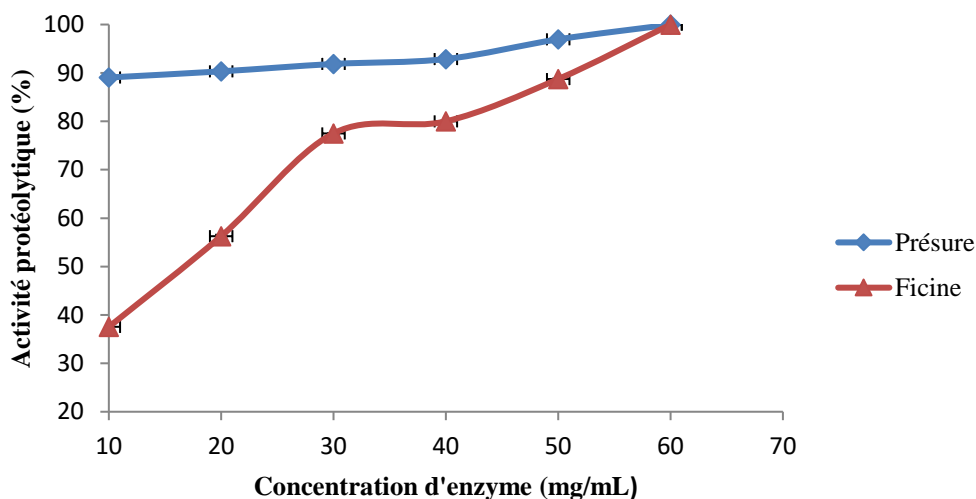


Figure 12 : représentation graphique de l'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique des extraits enzymatiques étudiés.

Les résultats obtenus, montrent que la concentration de l'enzyme influence l'activité protéolytique des deux extraits étudiés, et l'augmentation de la concentration de l'enzyme dans le milieu réactionnel entraîne une augmentation de l'activité protéolytique des deux enzymes.

L'activité protéolytique la plus faible est enregistrée à la concentration de l'enzyme de l'ordre de 10mg/ml, qui est estimée à 35% pour la ficine et à 90% pour la présure. Cette activité augmente, avec une allure plus importante, pour l'extrait de ficine par rapport à l'extrait enzymatique de présure, pour les mêmes concentrations d'enzymes dans le milieu. Plusieurs auteurs ont rapportés l'existence de corrélation linéaire hautement significative entre la concentration de l'enzyme dans le milieu et le temps de coagulation (Hyslop et al., 1979; Kopelman and Cogan, 1976).

Des études ont démontré l'existence d'une bonne corrélation ($r > 0.75$) entre le taux de formation de gels, et sa fermeté ainsi que le temps de coagulation avec la concentration de l'enzyme dans le milieu (Carlson et al., 1987; Lopez et al., 1998).

Plus la concentration de l'enzyme augmente dans le milieu plus le temps de coagulation diminue, avec une augmentation du taux de gel mais sa fermeté s'affaiblit (Nájera et al., 2003).

III. Etude comparative entre deux fromages frais élaborés par chaque extrait enzymatique

III.1. Caractérisation physico-chimique de la poudre de lait

Les différentes spécifications des paramètres physico-chimiques de la matière première ont été fournies par le fournisseur (Tableau II).

Tableau II: Résultats des analyses physicochimiques des poudres de lait.

Analyse	Résultat	Norme Soummam
pH à 10%	6,62	6,5 à 6,7
Acidité Dornic (°D)	13,20	12 à 19
Taux d'humidité (%)	3,71	< 5
Masse volumique (g/mL)	0,59	0,55 à 0,80
Taux de matière grasse (%)	0,20	12 max
Taux de protéines (%)	33,70	34 à 39

D'après les résultats obtenus, la poudre de lait de type *low heat* utilisée pour la fabrication du fromage frais est conforme et répond aux normes exigées par l'entreprise Soummam.

En effet, les résultats enregistrés à savoir : 6,62 ; 13,20°D ; 3,71% ; 0,59g/mL ; 0,20% ; 33,70% qui sont attribués respectivement aux paramètres suivants : pH, acidité Dornic, taux d'humidité, masse volumique, taux de matière grasse et le taux de protéines se situent dans l'intervalle de conformité de chaque paramètre.

III.2. Caractérisation physico-chimique du fromage

Tableau III : Résultats des analyses physicochimiques du fromage.

Analyse	Fromage fait avec l'extrait brut de ficine	Fromage fait avec la présure
pH	6,19 ^a	6,20 ^a
Acidité Dornic (°D)	36,00 ^a	35,67 ^a
Taux de l'extrait sec total (%)	19,45 ^b	23,79 ^a

Les lettres a et b, représentent l'existence de différence significative ($p \leq 0.05$)

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative ($p \leq 0,05$) entre l'acidité Dornic et la valeur du pH des deux fromages étudiés, tandis que le taux d'extrait sec total présente différence significative, ce qui peut être probablement due à la perte des protéines caséiniques dans le lactosérum, de fromage coagulé par l'action de la ficine (tableau III).

III.3. Caractérisation physico-chimique du lactosérum

Afin de mieux comparer les deux extraits, la recherche de taux de résidus protéiniques (taux de protéine), ainsi que les autres composants (pH, lactose, extrait sec total) s'avèrent fondamentale. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau IV.

Tableau IV: Résultats des analyses physicochimiques du lactosérum.

Analyse	Lactosérum (l'extrait brut de ficine)	Lactosérum (la présure)
pH	6,13 ^a	6,16 ^a
Taux de protéine (%)	1,22 ^a	0,59 ^b
Taux du lactose (%)	6,58 ^b	7,49 ^a
Taux de l'extrait sec total (%)	9,38 ^a	8,67 ^b

Les lettres a et b, représentent l'existence de différence significative ($p \leq 0,05$)

Les résultats obtenus montrent aucune différence significative ($p \leq 0,05$) entre la valeur du pH des deux lactosérums étudiés, tandis que le taux d'extrait sec total, taux de protéine, ainsi que le taux de lactose dans le lactosérum présentent des différences significatives.

Le taux de protéines et l'extrait sec total sont plus élevés dans le lactosérum issue par coagulation avec la ficine, avec des valeurs respectivement de l'ordre de 1,22% et 9,38%, tandis que pour le taux de lactose le plus élevé est retrouvé dans le lactosérum issue par coagulation avec de la présure dont sa valeur est en moyenne 7,49.

IV. 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 Odeur, Couleur, Goût, Texture, Dureté et tartinabilité sont donnés respectivement dans la figure n°13.

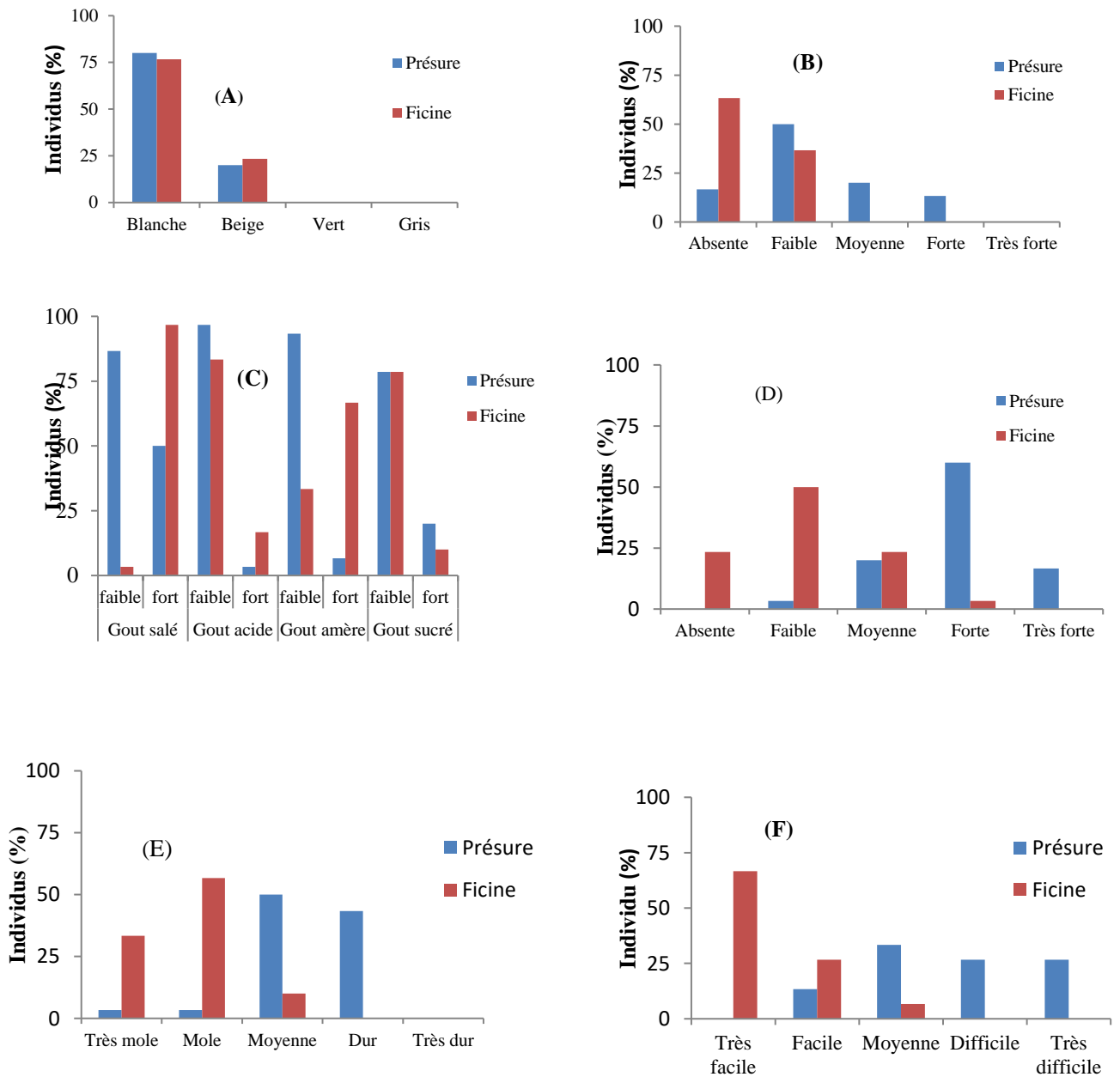


Figure 13: Histogramme des résultats de l'analyse sensorielle des deux fromages étudiés.

A : Couleur B : Odeur C : Gout D : Texture E : Dureté F : Tartinabilité

Les résultats de l'analyse sensorielle obtenus, montrent que les deux fromages présentent des points communs et des points de divergence.

La couleur des deux fromages est de tendance blanchâtre à majorité des dégustateurs, avec un reflet beige, et ceci pour les deux fromages étudiés. Ceci montre la grande ressemblance vis-à-vis du critère étudié.

De même pour le critère d'odorat, les résultats obtenus, confirment l'absence de l'odeur pour les deux fromages, même si une odeur légèrement faible est ressentie par certains candidats de dégustation vis-à-vis du fromage issu de la coagulation par la présure.

Les dégustateurs ont jugé que le goût des fromages obtenus par l'extrait brut de ficine acceptable. Il est faiblement sucré et acide, fortement salé avec un arrière goût d'amertume fortement prononcé. Cette caractéristique a été constatée par plusieurs auteurs dans les fromages issus de la coagulation par la ficine (Fadyloğlu, 2001; Öner and Akar, 1993).

La diminution de la quantité de l'enzyme utilisée et par conséquent, l'augmentation du temps de coagulation pourrait probablement palier au problème d'amertume rencontré dans les fromages fabriqués.

Le fromage issu de la coagulation par la présure, présente une bonne stabilité de goût. En effet, il est considéré moyennement salé et faiblement acide et sucré.

Pour la texture des fromages obtenus avec l'extrait brut de la ficine, nous avons remarqué que les dégustateurs ont apprécié sa texture lisse, cette texture lisse est due à la nature du caillé obtenu qui est caractérisé par des grains de taille réduite.

Par contre, le fromage obtenu avec l'extrait de présure est caractérisé par une pâte homogène et plus au moins lisse et présente une texture plus ferme. En effet, cette stabilité est due à la faible activité protéolytique que possède la présure ainsi qu'à la spécificité de son action sur les caséines.

La dureté des deux fromages présente une différence, de faible ou légère pour le fromage de la ficine, et de moyenne à forte pour le fromage de la présure. Ceci est confirmé par les résultats de l'estimation de la tartinabilité des deux fromages. En effet, les résultats montrent que le fromage obtenu par la ficine présente un degré de tartinabilité élevé contrairement à celui issu de la coagulation par la présure.

D'après les résultats de la préférence des jurys (figure n°14), le fromage issue de la coagulation par la présure été plus estimé par rapport a celui de la ficine, surtout pour ses qualité de gout et d'odeur. Tandis que pour le fromage fabriqué par la coagulation avec la ficine, il été apprécié surtout pour sa texture, son gout amer et sa couleur.

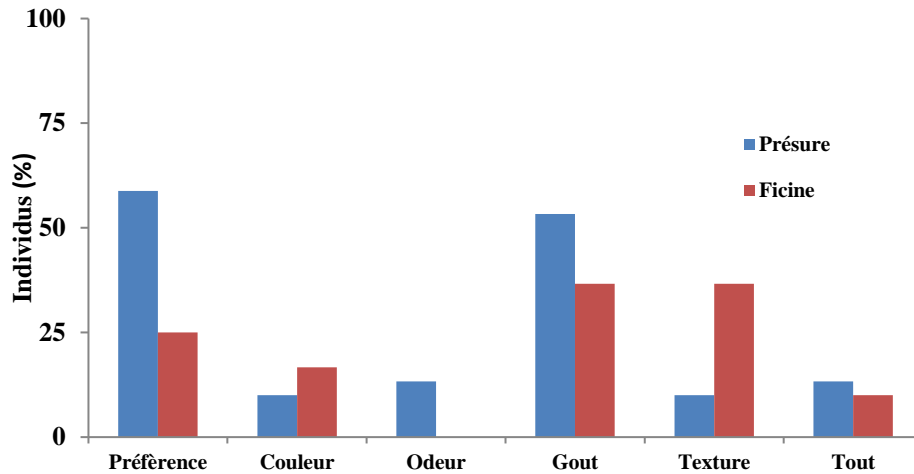


Figure 14: Histogramme des résultats de l'analyse sensorielle des deux fromages étudiés.

Au terme de cette étude sensorielle, il est à constater que l'extrait brut de la ficine, présente des avantages qui lui permettent de remplacer la présure dans la fabrication des fromages frais. En effet, les paramètres texture, couleur et le goût et à moindre degré l'odeur répondent aux exigences requises pour ce type de fromage et sont proches de ceux du fromage issu de la coagulation par la présure.

Conclusion

Ce travail est entrepris afin d'étudier la possibilité de substituer la présure (d'origine animale) par l'extrait brut de ficine (d'origine végétale). Ce dernier est utilisé dans les pratiques traditionnelles pour la fabrication des fromages (*Agugli*).

Le but de l'étude visait en premier lieu, la caractérisation des deux agents coagulants et le test de la possibilité de l'utilisation de l'extrait brut de ficine dans la fabrication de fromages. Notre démarche a comporté deux étapes. Premièrement la récupération de la matière première d'origine végétale renfermant le système enzymatique recherché, l'extraction de l'extrait enzymatique brut de ficine, la préparation de la solution de présure et la caractérisation des extraits du point de vue activité protéolytique, coagulante et force coagulante et conditions optimales d'activité (température, pH, concentration en CaCl_2 et concentration d'enzymes).

En second lieu, une fabrication et comparaison entre deux fromages frais, l'un élaboré avec la présure et l'autre fabriqué en substituant la présure par l'extrait de ficine suivant un diagramme de fabrication légèrement modifié par rapport à celui de l'industrie. Pendant cette étape, l'étude des paramètres physico-chimiques des deux fromages obtenus avec leurs lactosérums respectifs a été réalisée.

L'extraction de la ficine brute et la préparation de la solution de présure, ont permis d'avoir des extraits enzymatiques dont les caractéristiques sont les suivantes :

Une activité protéolytique de $167,81 \pm 0,51 \mu\text{g/mL.h}$ pour l'extrait brut de ficine, estimée six fois plus élevée que celle de la présure, une activité protéolytique spécifique de $2,47 \mu\text{g/mg.h}$ de protéine, une activité coagulante de $14,53 \pm 0,18 \text{ UP}$ et une teneur en protéines de $67,95 \text{ mg/ml}$.

Une activité protéolytique de $28,2 \pm 0,50 \mu\text{g/mL.h}$ pour la présure, une activité protéolytique spécifique de $12,59 \mu\text{g/mg.h}$ de protéine, une activité coagulante de $5,33 \pm 0,03 \text{ UP}$ et une teneur en protéines de $2,24 \text{ mg/mL}$.

L'étude des conditions optimales d'activité a montré des différences de comportement entre les deux extraits enzymatiques. Le pH optimal de coagulation pour l'extrait de ficine est dans le domaine neutre évalué à 8 contrairement à celui de la présure évalué à 5,5.

Pour la température optimale de coagulation, les résultats obtenus révèlent une différence de comportement entre les deux extraits enzymatiques. En effet, l'optimum d'activité pour la ficine est obtenu à une température avoisinant $60\text{-}65^\circ\text{C}$ et la présure à 37-

38°C. Concernant la concentration en chlorure de calcium, nous avons remarqué que l'optimum pour la ficine et la présure est de 0,05 M, et l'augmentation de la concentration de l'enzyme dans le milieu réactionnel entraîne une augmentation de l'activité protéolytique des deux enzymes.

L'essai de fabrication d'un fromage frais par utilisation des extraits bruts de ficine a donné un rendement plus faible comparé à celui de la présure. Les fromages obtenus présentent des caractéristiques organoleptiques assez proches, avec des distinctions quant à une texture encore plus molle, fortement salé et un goût assez amer. L'ordre de préférence des fromages par les dégustateurs est : le fromage obtenu par la présure puis le fromage à l'extrait de la ficine. La protéolyse est plus avancée dans les fromages obtenus avec la ficine que dans les fromages obtenus 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 en partant des pratiques traditionnelles. Ces extraits sont obtenus à partir de matières assez disponibles et inexploitées.

Cependant il est intéressant de compléter cette étude par :

- L'étude des paramètres influençant l'extraction de l'extrait enzymatique végétal afin d'améliorer la qualité des extraits et le rendement d'extraction;
- La purification de ces enzymes afin d'envisager d'autres utilisations ;
- La possibilité d'utilisation de l'extrait de la ficine pour la fabrication d'autres types de fromages ;
- L'étude de valorisation des fromages obtenus par l'extrait de ficine pour masquer ou atténuer l'amertume.

Références Bibliographiques

- Agrawal AA and Konno K (2009) Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:311-331.
- Akar B and Fadiloglu S (1999) Teleme production by purified ficin. *Journal of Food Quality* 22:671-680.
- Al Kanhal HA (2010) Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal* 20:811-821.
- Alais C (1984) Principes des techniques laitières. *Science du Lait*:196-197.
- Arribère Mpmc, Caffini O and Priolo S (2000) Proteolytic Enzymes from the Latex of *Ficus punzila* L.(Moraceae). *Acta Far ni Botiueretise* 19:257-262.
- 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.
- Balcones E, Olano A and Calvo MM (1996) Factors affecting the rennet clotting properties of ewe's milk. *Journal of agricultural and food chemistry* 44:1993-1996.
- 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.
- 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.
- Berridge N (1952) Some observations on the determination of the activity of rennet. *Analyst* 77:57b-62.
- Berridge N.J. (1955) Purification and assay of rennin. *Methods in enzymology*. Ed. Perlmann G.E. and Loran Acad. Press Inc., New York. Vol. 2. 69-77
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72. 248-254.
- Brulé G, Lenoir J and Remeuf F (1997) La micelle de caséine et la coagulation du lait. *Le Fromage*, Lavoisier Tec & Doc, Paris:7-41.
- Carlson A, Hill Jr CG and Olson NF (1987) Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. *Biotechnology and bioengineering* 29:582-589.
- Cattaneo T, Nigro F, Messina G and Giangiacomo R (1994) Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase. *Milchwissenschaft* 49:269-272.
- Cheftel J, Cheftel H and Besancon P (1977) Introduction a la biochimie et a la technologie des aliments.
- Claverie-Martín F and Vega-Hernández MC (2007) Aspartic proteases used in cheese making, in *Industrial enzymes* pp 207-219, Springer.

- Cullen D, Gray GL, Wilson LJ, Hayenga KJ, Lamsa MH, Rey MW, Norton S and Berka RM (1987) Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Bio/technology* 5:369.
- Dalgleish DG (1992) Sedimentation of casein micelles during the storage of ultra-high temperature milk products—A calculation. *Journal of dairy science* 75:371-379.
- Daviau C, Famelart M-H, Pierre A, Goudédranche H and Maubois J-L (2000) Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Le lait* 80:397-415.
- Dehgan B (1998) *Landscape plants for subtropical climates*, University Press of Florida Gainesville.
- Devaraj K, Gowda LR and Prakash V (2008) An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry* 69:647-655.
- Devaraj K, Kumar PR and Prakash V (2011) Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. *Process biochemistry* 46:458-464.
- Di Pierro G, O’Keeffe MB, Poyarkov A, Lomolino G and FitzGerald RJ (2014) Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica* L.-derived proteinase. *Food chemistry* 156:305-311.
- Durand P (1982) Etude de la fraction azotée soluble de l’anchois sale en cours de maturation. *Revue Travaux, Institut des Pêches Maritimes* 45:271-281.
- Dybowska B (1996) Effects of temperature and GDL concentration on milk aggregation and gelation process as revealed by optical method. *Milchwissenschaft* 51:557-560.
- Dybowska B and Fujio Y (1996) Effect of temperature and glucono-delta-lactone (GDL) concentration on aggregation and gelation process as revealed by optical method. *Milchwissenschaft (Germany)*.
- Eck A (1990) *El queso*. Ed. Omega, Barcelona, España.
- Emtage J, Angal S, Doel M, Harris T, Jenkins B, Lilley G and Lowe P (1983) Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80:3671-3675.
- 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 caprifyg (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *European Food Research and Technology* 234:527-533.
- Fadyoğlu S (2001) Immobilization and characterization of ficin. *Food/Nahrung* 45:143-146.
- Farkye NY (2004) Cheese technology. *International journal of dairy technology* 57:91-98.
- Feijoo-Siota L and Villa TG (2011) Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess technology* 4:1066-1088.
- Flüeler O and Puhan Z (1978) Neue Erkenntnisse über die Labträgheit der Milch. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung* 7:61-68.
- Foltmann B, Drøhse HB, Nielsen PK and James MN (1992) Separation of porcine pepsinogen A and progastricsin. Sequencing of the first 73 amino acid residues in

- progastricsin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1121:75-82.
- Foltmann B, Jensen AL, Lønblad P, Smidt E and Axelsen NH (1981) A developmental analysis of the production of chymosin and pepsin in pigs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 68:9-13.
- Fox PF, McSweeney PL and Paul L (1998) *Dairy chemistry and biochemistry*, 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.
- Gastaldi E, Pellegrini O, Lagaude A and de la Fuente BT (1994) Functions of added calcium in acid milk coagulation. *Journal of food science* 59:310-312.
- Gaussen H (1982) *Précis de botanique*.
- Génin G (1968) Les succédanés de la présure. *Le lait* 48:53-59.
- Germonville A (2003) *Coagulants. Techniques de l'Ingénieur Agroalimentaire (France)*.
- Gonzalez-Rabade N, Badillo-Corona JA, Aranda-Barradas JS and del Carmen Oliver-Salvador M (2011) Production of plant proteases in vivo and in vitro—a review. *Biotechnology advances* 29:983-996.
- Green ML and Stackpoole A (1975) The preparation and assessment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase–swine pepsin mixture for Cheddar cheese-making. *Journal of Dairy Research* 42:297-312.
- Grzonka Z, Kasprzykowski F and Wiczak W (2007) Cysteine proteases, in *Industrial enzymes* pp 181-195, Springer.
- Hames D and Hooper N (2004) *Instant notes in biochemistry*, Taylor & Francis.
- Harboe M, Broe M and Qvist K (2010) The production, action and application of rennet and coagulants. *Technology of cheesemaking* 2.
- Harbutt J (2009) *World cheese book*, Penguin.
- Hipp N, Groves ML, Custer J and McMeekin T (1952) Separation of α -, β - and γ -casein. *Journal of dairy science* 35:272-281.
- Horne D and Banks J (2004) Rennet-induced coagulation of milk. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* 1:47-70.
- Humme H (1972) Optimum pH for the limited specific proteolysis of kappa-casein by rennin (primary phase of milk clotting). *Nederlands melk-en zuiveltijdschrift*.
- Hyldig G (1993) Rennet coagulation. Effect of technological parameters on the enzymatic reaction and gel formation in milk and UF concentrates, Ph. D. thesis, The Royal Veterinary and Agriculture University Copenhagen
- Hyslop DB, Richardson T and Ryan DS (1979) Kinetics of pepsin-initiated coagulation of κ -casein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 566:390-396.
- Isselnane S (2014) Caractérisation chromatographique et électrophorétique de l'extrait coagulant issu de caillettes de dromadaires adultes, Université Mouloud Mammeri.

- Jacob M, Jaros D and Rohm H (2011) Recent advances in milk clotting enzymes. *International journal of dairy technology* 64:14-33.
- Janhøj T and Qvist K (2010) The formation of cheese curd, in *Technology of cheesemaking* pp 130-165, Wiley Online Library.
- Jean B (2009) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.), Lavoisier.
- Jeantet R, Croguennec T, Garric G and Brulé G (2017) *Initiation à la technologie laitière*, Editions Tec & Doc Lavoisier.
- Johnson M and Lucey J (2006) Major technological advances and trends in cheese. *Journal of dairy science* 89:1174-1178.
- Joseph B and Raj SJ (2011) Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn—An overview. *International journal of pharmtech research* 3:8-12.
- 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.
- Kim Y, Park S, Lee E, Cerbo R, Lee S, Ryu C, Kim G, Kim J and Ha Y (2008) Antibacterial compounds from rose Bengal-sensitized photooxidation of β -caryophyllene. *Journal of food science* 73:C540-C545.
- Kopelman I and Cogan U (1976) Determination of clotting power of milk clotting enzymes. *Journal of dairy science* 59:196-199.
- Kowalchuk A and Olson N (1977) Effects of pH and temperature on the secondary phase of milk clotting by rennet. *Journal of dairy science* 60:1256-1259.
- 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 A, Grover S, Sharma J and Batish V (2010) Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical reviews in biotechnology* 30:243-258.
- Kumar VV, Sathyaselvabala V, Premkumar M, Vidyadevi T and Sivanesan S (2012) Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74:63-72.
- Lansky EP, Paavilainen HM, Pawlus AD and Newman RA (2008) *Ficus* spp.(fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology* 119:195-213.
- Li J and Dalgleish D (2006) Mixed coagulation of milk—gel formation and mechanism. *J Agric Food Chem* 54:4687-4695.
- 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.
- Lopez M, Lomholt S and Qvist K (1998) Rheological properties and cutting time of rennet gels. Effect of pH and enzyme concentration. *International Dairy Journal* 8:289-293.
- Lowe G (1976) The cysteine proteinases. *Tetrahedron* 32:291-302.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Lucey J (2002) CHEESE| Rennet Coagulation of Milk.
- Lynn K and Clevette-Radford N (1986) Ficin E, a serine-centred protease from *Ficus elastica*. *Phytochemistry* 25:1559-1561.
- Mahaut M, Jeantet R and Brulé G (2000) *Initiation à la technologie fromagère*, Editions Tec & Doc.
- Masfufatun,(2009) Isolasi dan karakterisasi enzim selulase.[http://fk.uwks.ac.id/archive/journal/vol.\[12 june 2019\]](http://fk.uwks.ac.id/archive/journal/vol.[12%20june%202019].).
- McMahon DJ, Richardson G and Brown R (1984) Enzymic milk coagulation: Role of equations involving coagulation time and curd firmness in describing coagulation. *Journal of dairy science* 67:1185-1193.
- 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.
- Mehaia MA, Hablas MA, Abdel-Rahman KM and El-Mougy SA (1995) Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. *Food chemistry* 52:115-122.
- Mellor J, Dobson M, Roberts N, Tuite M, Emtage J, White S, Lowe P, Patel T, Kingsman A and Kingsman S (1983) Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 24:1-14.
- Mohanty A, Mukhopadhyay U, Grover S and Batish V (1999) Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology advances* 17:205-217.
- Montilla A, Balcones E, Olano A and Calvo MM (1995) Influence of heat treatments on whey protein denaturation and rennet clotting properties of cow's and goat's milk. *Journal of agricultural and food chemistry* 43:1908-1911.
- Nájera A, De Renobales M and Barron L (2003) Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food chemistry* 80:345-352.
- Nassar A and Newbury H (1987) Ficin production by callus cultures of *Ficus carica*. *Journal of plant physiology* 131:171-179.
- 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.

- Patel R and Reuter H (1986) Effect of sodium, calcium and phosphate on properties of rennet coagulated milk. *Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie= Food science+ technology*.
- Pourmorad F, Honary S, Azadbakht M, Asgarirad H and Golmohammadzadeh G (2011) Separation of proteolytic components of Iran ficus carica latex by column chromatography and electrophoresis and latex anticorn activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Reasearch* 1:83-85.
- Ramet J (1997) Les agents de la transformation du lait; in «Le fromage» éd. Eck et Gillis Tec Doc 3:105-111.
- Raposo S and Domingos A (2008) Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process biochemistry* 43:139-144.
- Rawlings ND, Tolle DP and Barrett AJ (2004) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids research* 32:D160-D164.
- Robbins BH (1930) A Proteolytic Enzyme in Ficin, the Anthel-mintic Principle of Leche de Higueron. *Journal of Biological Chemistry* 87.
- Robinson R and Wilbey R (1998) Coagulants and precipitants, in *Cheesemaking Practice* pp 146-164, Springer.
- Robitaille G, Lapointe C, Leclerc D and Britten M (2012) Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropeptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. *Journal of dairy science* 95:1-8.
- Roseiro LB, Barbosa M, Ames JM and Wilbey RA (2003) Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International journal of dairy technology* 56:76-85.
- Schmidt D (1982) Association of caseins and casein micelle structure. *Developments in dairy chemistry*.
- Schuck P, Mahaut M, Jeantet R and Brulé G (2000) *Les produits industriels laitiers*, Lavoisier TEC et DOC Editions.
- 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 H (2014) Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait. Mémoire de magister, université frères Mentouri Constantine. Institut de la Nutrition, Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires. 105p.
- Singleton A and Buttle DJ (2013) Ficin, in *Handbook of Proteolytic Enzymes* pp 1877-1879, Elsevier.
- Smyth SJ (2014) The state of genetically modified crop regulation in Canada. *GM crops & food* 5:195-203.
- Solorza F and Bell A (1998) The effect of calcium addition on the rheological properties of a soft cheese at various stages of manufacture. *International journal of dairy technology* 51:23-29.
- Storry JE, Grandison AS, Millard D, Owen AJ and Ford GD (1983) Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research* 50:215-229.

- 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.
- Tang J, Sepulveda P, Marciszyn J, Chen K, Huang W, Tao N, Liu D and Lanier J (1973) Amino-acid sequence of porcine pepsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70:3437-3439.
- Tarté R (2009) *Ingredients in meat products: properties, functionality and applications*, Springer.
- Tervala H-L, Antila V and Syväjärvi J (1986) Factors affecting the renneting properties of milk.
- Tunick MH (2008) Whey protein production and utilization: a brief history. Whey processing, functionality and health benefits:1-13.
- Van Hooydonk A, Boerrigter I and Hagedoorn H (1986) pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 2. Effect of pH on renneting of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal (Netherlands)*.
- van Oort M and Whitehurst RJ (2010) *Enzymes in food technology*, Wiley-Blackwell.
- Vidaud J (1987) [Fig. Production on decrease]. [French]. *Infos CTIFL*.
- Walstra P (1999) *Dairy technology: principles of milk properties and processes*, CRC Press.
- Walstra P and Jenness R (1984) *Dairy chemistry & physics*, John Wiley & Sons.
- Williams DC, Sgarbieri VC and Whitaker JR (1968) Proteolytic activity in the genus *Ficus*. *Plant physiology* 43:1083-1088.
- Yang Y, Shen D, Long Y, Xie Z and Zheng H (2017) Intrinsic peroxidase-like activity of ficin. *Scientific reports* 7:43141.
- Zare H, Moosavi-Movahedi AA, Salami M, Mirzaei M, Saboury AA and Sheibani N (2013) Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. *Phytochemistry* 87:16-22.

Annexes

Annexe I : Présentation de la laiterie SOUMMAM d'Akbou

De création relativement récente (janvier 1993), la Laiterie SOUMMAM d'Akbou est spécialisée dans la production de yaourts et crème dessert.

A son démarrage, la Laiterie comptait une seule ligne de production d'une capacité de 4 000 pots / heure et une vingtaine de salariés. En mai 2000, cette unité s'est implantée dans son nouveau site de Taharacht (Akbou, Wilaya de Bejaia) avec des capacités de production plus importantes qui atteignent aujourd'hui une moyenne de plus de 2,5 millions pots / jour et emploie pas moins de 900 personnes dont une forte proportion d'ingénieurs et de techniciens. Son capitale sociale est de 15 000 000.00 DA.

L'entreprise possède une gamme de production variée de plus de 30 produits différents et 17 lignes de production composées d'équipements récents et une technologie appropriée. L'unité livre ses produits à travers tout le territoire national, grâce à :

- une infrastructure de stockage sous froid de plus de 20 000 m³ répartie en 1 dépôt central et 4 dépôts régionaux (Oran, Alger, Constantine et Annaba) ;

- un réseau de distributeurs agréés répartis à travers la presque totalité des wilayas du pays.

La Laiterie SOUMMAM exporte depuis 2001 ses différents produits à la Libye et compte conquérir, dans les années à venir, d'autres marchés étrangers.

En outre, à partir de l'année 2010, La Laiterie SOUMMAM a entamé la création de sa propre pépinière de génisses pour satisfaire ses besoins en lait cru, dans l'optique de réduire sa dépendance vis à vis de la poudre de lait d'importation. L'unité a aussi mis en place 13 centres de collecte opérationnels pour faciliter l'acheminement du lait de l'éleveur à l'unité de transformation.

Annexe II : Dosage des protéines par la méthode (Bradford, 1976).

II-1 Préparation de réactif de BRADFORD

- 100mg de bleu de Coomassie G-250 ;
 - 50 ml d'éthanol à 95% ;
 - 100 ml 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.

II-2 Elaboration de la courbe d'étalonnage des protéines

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).

N° tube	Blanc	1	2	3	4	5
BSA (µl)	0	100	200	300	400	500
Eau distillée (µl)	500	400	300	200	100	0
Total (µl)	500	500	500	500	500	500
Réactif Bradford (µl)	2000					

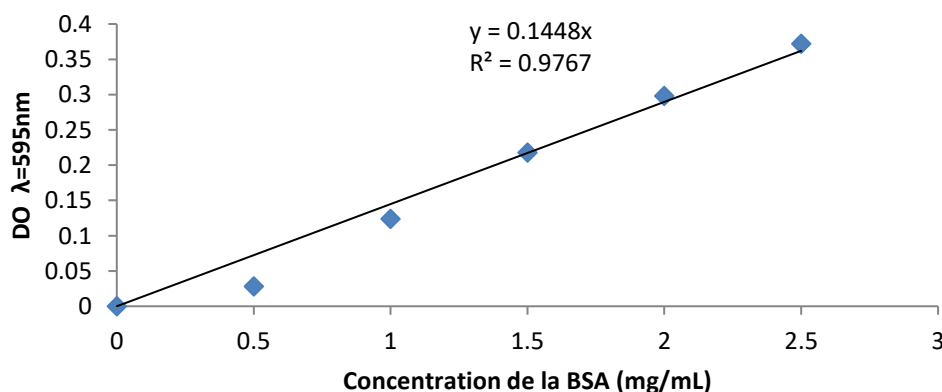


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de la solution de SAB (1mg/mL) Bradford, (1976).

Annexe III : MESURE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

III-1 Courbe d'étalonnage de la tyrosine

Tableau II : Préparation de la gamme d'étalonnage de la Tyrosine (250 μ g/mL)

N tube	Blanc	1	2	3	4	5
Dilution	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Tyrosine (μ L)	0	100	200	300	400	500
Tampon phosphate 0,1 M pH 7 (μ L)	500	400	300	200	100	0
Solution C (mL)	2,5					
Incubation à 35°C pendant 10 min,						
Folin-Ciocalteu (μ L)	250					
Incubation à 35°C pendant 20 min,						
Lire l'absorbance à 660 nm						

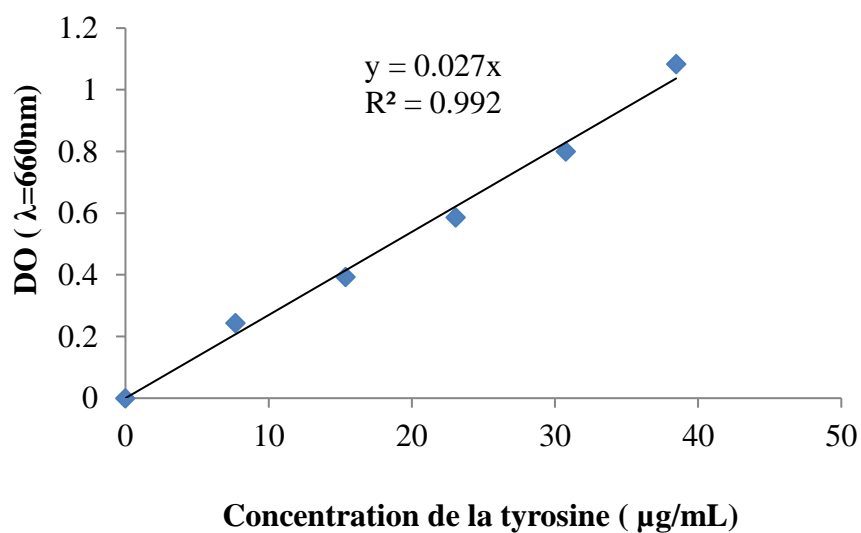


Figure 2 : Courbe d'étalonnage obtenu avec la tyrosine.

Annexe IV : Détermination de la teneur en protéines



Figure 3 : Milkoscan FT1

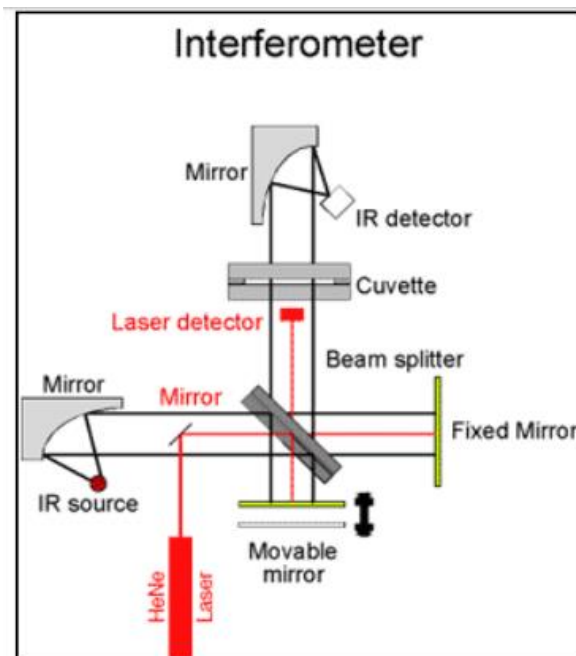


Figure 4 : L'interféromètre en image

Annexe V : 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 cocher les cases correspondant à l'impression ressentie, selon l'intensité des descripteurs suivants :

Il vous est demandé d'évaluer les différentes caractéristiques en attribuant une note 1 et 5.

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

I. Couleur :

1-Blanche

2-Beige

3- Verte

Echantillon	1	2
Note attribuée		

II. Odeur :

1- Absente

2- Faible

3- Moyenne

4- Forte

5- Très forte

Echantillon	1	2
Note attribuée		

III. Gout :

a. Gout salé

1- Faible

2- Fort

Echantillon	1	2
Note attribuée		

b. Gout acide :

1- Faible

2- Fort

Echantillon	1	2
Note attribuée		

c. Gout amère :

1- Faible

2- Fort

Echantillon	1	2
Note attribuée		

d. Gout sucré :

1- Faible

2- Fort

Echantillon	1	2
Note attribuée		

IV. Texture :**a. Texture granuleuse**

1-Absente

2-Faible

3-Moyenne

4-Forte

4-Très forte

Echantillon	1	2
Note attribuée		

b. Dureté

1-Très mole

2-Mole

3-Moyenne

4-Dur

5-Très dur

Echantillon	1	2
Note attribuée		

c. Tartinabilité

1- Très facile

2- Facile

3- Moyenne

4- Difficile

5- Très difficile

Echantillon	1	2
Note attribuée		

V. Préférence

1- Agréable

2- Désagréable

Echantillon	1	2
Note attribuée		

- Quels sont les caractéristiques qui ont motivés votre choix :

1- Couleur

2- Odeur

3- Gout

4- Texture

5- Tout

Echantillon	1	2
Note attribuée		

Annexe VI : Appareillage

Appareillage utilisé aux Laboratoires de la Laiterie SOUMMAM d'Akbou

- Acidimètre ;
- Bain Marie (Memmert) ;
- Balance analytique à affichage digital (précision : 0,01g) ;
- Butyromètre de GERBER ;
- Centrifugeuse de paillasse ;
- Dessiccateur (Sartorius) ;
- Etuve Memmert (Allemagne) ;
- Mixeur ;
- pH mètre (730 WTW, série MOLAB)
- Thermomix ;
- MilkoscanFT1

Appareillage utilisé au laboratoire de l'université

- Balance de précision à 0,01g (SARTORIUS);
- Centrifugeuse (SIGMA) ;
- ph mètre (Hanna-instruments) ;
- Spectrophotomètre UV-Visible (SCHIMADZU, Japon) ;
- Bain marie
- Etuve

Un certain nombre de petit matériel approprié a été également utilisé dans cette étude. Il s'agit de : micropipettes, seringues, eppendorfs, coupelle en aluminium, spatule en inox et équipements de protection individuelle (gant, masque respiratoire, blouse, lunette...) 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, alcool iso-amylque, soude, tyrosine, phosphate de sodium monobasique et dibasique, réactif de Folin-Ciocalteu, carbonate de sodium, tartrate sodium-potassium, sulfate de cuivre ...).
- sérum albumine bovine (BSA), (SIGMA ; USA) ;
- Caséine 1% ;
- Chlorure de calcium

Résumé

L'objectif du présent travail est d'étudier la possibilité d'utilisation de la ficine extraite du latex du figuier *Ficus carica*, comme succédané de la présure. Pour atteindre ce but, une caractérisation physicochimique, en déterminant la teneur en protéines, l'activité et la force coagulante, l'activité protéolytique, de l'extrait de ficine et de la présure a été effectuée.

Les principaux résultats obtenus ont montrés que l'extrait de la ficine présente une teneur en protéines de $67,95 \pm 3,63$ mg/mL et une activité coagulante de $14,53 \pm 0,18$ UP. Pour la présure, la teneur en protéines est estimée à $2,24 \pm 0,03$ mg/mL et l'activité coagulante est de $5,33 \pm 0,03$ UP. En plus, l'activité protéolytique a été estimée à $167,81 \pm 0,51$ µg et à $28,2 \pm 0,50$ µg d'équivalent tyrosine par ml d'enzyme respectivement pour la ficine et la présure.

L'étude de l'influence des paramètres physicochimiques du lait (pH, température, concentration en CaCl_2 et de la concentration de l'extrait enzymatique) sur l'activité coagulante et protéolytique de la ficine et de la présure a été réalisée.

D'autre part, Un essai de l'utilisation de la ficine et de la comparer à la présure dans la coagulation du lait pour la préparation d'un fromage frais a été réalisé.

Les fromages frais obtenus avec la ficine et la présure ont présenté de grandes ressemblances sur le plan couleur et odeur. Néanmoins, certaines différences ont été constatées, notamment au niveau de l'amertume et de la texture.

Ces résultats reflètent la possibilité de substituer la présure par l'extrait de la ficine, dans la fabrication des fromages. Cependant, cette étude mérite d'être élargie à d'autres fromages et poursuivie en vue d'une amélioration des rendements fromagers enregistrés et de la qualité des fromages obtenus.

Mots clés : Ficine, succédané de présure, coagulation, fromage frais.

Absract

The objective of the present work is to study the possibility of using ficin extracted from the fig tree *Ficus carica* latex, as a rennet substitute. To achieve this goal, a physicochemical characterization, by determining the protein content, activity and coagulant strength, proteolytic activity, ficin extract and rennet was performed.

The main results obtained showed that the ficin extract has a protein content of $67,95 \pm 3,63$ mg / mL and a coagulant activity of $14,53 \pm 0,18$ UP. For rennet, the protein content is estimated at $2,24 \pm 0,03$ mg / mL and the coagulant activity is $5,33 \pm 0,03$ UP. In addition, the proteolytic activity was estimated at $167,81 \pm 0,51$ µg and at $28,2 \pm 0,50$ µg tyrosine equivalent per ml enzyme for ficin and rennet, respectively.

The study of the influence of physicochemical parameters of milk (pH, temperature, CaCl_2 concentration and enzymatic extract concentration) on the coagulant and proteolytic activity of ficin and rennet was carried out.

On the other hand, an attempt was made to use ficin and to compare it with rennet in the coagulation of milk for the preparation of a fresh cheese.

The fresh cheese obtained with ficine and rennet showed great similarities in terms of color and smell. Nevertheless, some differences were noted, especially in terms of bitterness and texture.

These results reflect the possibility of substituting rennet with ficin extract in cheese making. However, this study deserves to be extended to other cheeses and continued with a view to improving registered cheese yields and the quality of the cheeses obtained.

Key words: Ficin, rennet substitute, coagulation, fresh cheese.