

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2023

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES DANS LE CADRE N°12-75

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

HAMOUDA Salma & CHENNANI Anfal

Thème

**Application des enzymes protéolytiques de différentes
origines dans la fabrication du fromage frais et
Camembert**

Soutenu le: 24/10/2023

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>Mme. BOUTELDJA Razika</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme. BENSMAIL Souhila</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mr. TIGHILET Karim</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mdm. CHEWIRAF Zahira</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Responsable de cati</i>
<i>Mdm. BOUSSBAINE Tassadite</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Responsable d'incubateur</i>
<i>Mdm. YAHYAOUI Amina</i>	<i>/</i>	<i>/</i>	<i>Représente de socio-économiques</i>

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

Avant tous, nous remercions Dieu pour tout le courage et la force qu'il nous a donné pour faire ce travail.

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde reconnaissance envers **Mme BENSMAIL Souhila**, notre promotrice, pour avoir accepté de superviser notre travail. Ses conseils éclairés, son aide généreuse, sa gentillesse et sa disponibilité ont été d'une valeur inestimable. Son soutien constant a été une source d'inspiration.*

Nous remercions les membres du jury pour leur présence et d'avoir accepté l'évaluation de nos résultats, et nous les remercions par avance pour tous les conseils qui seront donnés lors de la soutenance.

*Nous souhaitons exprimer toute notre sincère reconnaissance envers **Mr AIT AKACHE**, responsable de l'incubateur, pour ses encouragements et son soutien constant tout au long de notre projet start-up. Sa motivation inébranlable a été une source d'inspiration majeure. Nos remerciements s'étendent également à l'ensemble des enseignants dont les formations et les conseils ont été précieux pour le développement de notre projet. Leur expertise a illuminé notre chemin et a considérablement enrichi notre travail.*

Nous tenons à exprimer notre sincère reconnaissance envers toutes les ingénieures des laboratoires de la faculté SNV-ST. Leur expertise et leur assistance ont grandement contribué à l'accomplissement de ce travail.

*Nous tenons également à exprimer notre gratitude envers l'équipe de l'industrie laitière **Faiz Lait** pour leur soutien et leur amabilité précieuse.*

Nos profonds remerciements s'adressent à l'ensemble des enseignants de la faculté SNV-ST de l'Université de Bouira.

Enfin, nous remercions tous nos amis et nos collègues, tous les personnes qui nous ont encouragé et soutenu de près ou de loin durant la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers Allah, le Tout-Puissant et Clément, pour m'avoir guidé dans la réalisation de ce travail.

Je dédie ensuite ce travail exceptionnel aux êtres les plus remarquables qui existent au monde, mes parents, À mon père RABEH et à ma chère maman, ma reine MALIKA, aucune quantité de dédicaces ne pourrait exprimer mes sincères sentiments. Leur patience illimitée, leur encouragement constant et leur aide ont été des piliers essentiels. C'est en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices.

À ma sœur unique MANEL et mon frère MOHAMED, je te remercie pour ton soutien et ta compréhension. Tu m'as encouragé, surtout dans les moments les plus difficiles.

Les mots me manquent pour exprimer pleinement mes sentiments envers vous.

Merci du fond du cœur pour vos encouragements constants et votre soutien moral durant toutes mes études.

À toute ma famille, qu'elle soit de la branche Chennani ou Kechekar, je souhaite exprimer ma reconnaissance pour leur soutien continu.

Pour mes meilleures amies : Lidia, Lina, Afifa et Mounia, je vous remercie pour votre amitié inestimable.

À mon binôme Salma, merci pour cette collaboration fructueuse.

Enfin, je souhaite dédier ce travail à chaque personne qui m'a apporté une aide, de près ou de loin, sans exception. Votre contribution a été inestimable dans la réalisation de ce projet.

Anfel

Dédicaces

Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU de m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Je tiens à dédier cet humble travail à mes chers parents et grands-parents, piliers de ma vie, dont l'amour et la guidance m'ont porté jusqu'ici.

À mes frères Amine, Abdou, Oussama et Salim, avec qui j'ai grandi et partagé tant de moments précieux. À mes sœurs Zineb et Zahra, compagnes de joie et de complicité. A mes neveux, qui apportent une douce lumière à chaque instant.

À mes belles-sœurs Houda et Jemina, qui ont enrichi ma vie par leur présence. À mes amies Chaima, Zina, Amira et Meriem, véritables étoiles dans mon ciel.

À mes collègues, qui ont été des compagnons de route exceptionnels.

À mes tantes et oncles, dont la présence bienveillante a enrichi mon chemin.

À mes cousines Sirine, Mayar, Miriam et Loubna, témoins de notre lien indéfectible.

À toute la famille Hamouda et Amrani.

À ma belle amie et binôme ANFEL complice de ce parcours.

Que ce mémoire soit un hommage à tous ceux qui ont tissé l'étoffe de ma vie. Vos prières et vos sourires sont les fondations de mes réalisations.

Merci du plus profond de mon cœur.

Salma

Table des matières

La liste des abréviations

La liste des figures

La liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I

Partie Bibliographique

I. Les enzymes protéolytiques 3

I.1. Généralités 3

I.2. Classification des protéases 3

I.2.1. Les exopeptidases 3

I.2.2. Les endopeptidases 4

I.3. Applications sélectionnées des protéases..... 6

I.3.1. Industrie des détergents 7

I.3.2. Industrie du cuir 7

I.3.3. Industrie alimentaire 7

I.3.4. Applications thérapeutiques..... 7

II. Coagulation du lait 8

II.1. Caractéristiques du lait 8

II.2. Protéines du lait 8

II.2.1. Caséines du lait..... 8

II.2.2. Protéines du lactosérum..... 10

II.3. La coagulation du lait..... 10

II.3.1. Coagulation par acidification 11

II.3.2. Coagulation par voie enzymatique 11

II.3.3. Coagulation mixte 11

II.4. Mécanisme de la coagulation enzymatique	11
II.4.1. Phase primaire	12
II.4.2. Phase secondaire	12
II.4.3. Phase tertiaire	12
III. Fromage	12
III.1. Définition	12
III.2. Classification des fromages	13
III.3. Principales étapes de fabrication du fromage	14
III.3.1. Préparation du lait	14
III.3.2. La coagulation.....	15
III.3.3. Egouttage	15
III.3.4. Le salage	16
III.3.5. L'affinage.....	17
IV. Sources de protéases exploitées	17
IV.1. Source animale	18
IV.2. Source végétale	19
IV.2.1. Classification et systématique.....	20
IV.2.2. Description botanique	20
IV.3. Source microbienne	22
IV.3.1. Classification	23
IV.3.2. Les caractéristiques morphologiques.....	23
IV.3.3. Applications de <i>M. circinelloides</i>	24
V. La présure	24
V.1. Origine et dénomination	25
V.2.Composition de la présure	25
V.2.1. Chymosine	25
V.3.Succédanés de présure	26

Chapitre II

Matériel & Méthodes

I. Matériel	28
I.1. Matériel non biologique	28
I.2. Matériel biologique	28
I.2.1. Préparation des proventricules.....	28
I.2.2. Récupération du latex de figuier.....	29
I.2.3. Préparation de la souche fongique.....	30
II. Méthodes	30
II.1. Extraction de la pepsine de poulet	30
II.2. Extraction de la ficine	31
II.3. Production de la protéase fongique par fermentation sur support solide	31
II.4. Essai de pré-purification	33
II.4.1. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium	33
II.4.2. Dialyse.....	34
II.4.3. Lyophilisation.....	34
II.5. Méthodes de dosage	34
II.5.1. Détermination de l'activité coagulante	34
II.5.2. Dosage des protéines	35
II.5.3. Mesure de l'activité protéolytique	35
II.6. Fabrication du fromage	36
II.6.1. Fromage frais.....	37
II.6.1.1 Processus de fabrication du fromage frais.....	37
II.6.2. Fromage à pâte molle type Camembert.....	37
II.6.3. Analyses physicochimiques	39
II.6.5. Analyse sensorielle.....	41

Chapitre III

Résultats et discussion

I. Résultats et discussion	42
I.1. Propriétés enzymatiques des extraits bruts	42
I.1.1. Activité coagulante	42
I.1.2. Activité protéolytique	43
I.1.3. Teneur en protéine	44
I.1.4. Rapport Activité coagulante/ Activité protéolytique	45
I.2. Essai de pré-purification des extraits bruts	45
I.3. Production du fromage frais	48
I.3.1. Caractéristiques physico-chimiques du lait utilisé	48
I.3.2. Caractérisation physico-chimique des fromages fabriqués	49
I.3.3. Analyse sensorielle des fromages fabriqués	50
I.3.4. Rendement fromager	53
I.4. Fabrication du fromage Camembert	54
I.4.1. Caractérisation physico-chimique des fromages fabriqués	54
I.4.2. Analyse sensorielle	54
I.4.4. Rendement fromager	56

Chapitre IV

Start-up

I. Introduction.....	57
II. Présentation du projet	58
II.1. L'idée du projet.....	58
II.2. Qu'est-ce que vous allez faire :.....	58
II. 3. Équipe de travail	59
II.4. Objectifs du projet.....	59
II.5. Calendrier de la réalisation du projet	60
III. Aspects innovants	60
III.1. Nature des innovations	60
III.2. Domaines d'innovation.....	61
IV. Analyse stratégique du marché	61
IV.1. Le segment du marché.....	61
IV. 2. Mesure de l'intensité de la concurrence.....	63
IV. 3. La stratégie marketing	63
V. Plan de production et d'organisation	64
V. 1. Processus de production	64
V. 2. L'approvisionnement.....	65
V. 3. La main d'œuvre	66
VI. Plan financier	67
VI.1. Coûts et charges.....	67
VI.2. Chiffre d'affaires.....	69
VI. 3. Comptes de résultats.....	70
VI. 4. Plan de trésorerie	71

Conclusion..... 72

Références Bibliographiques..... 74

Annexes

Résumés

Liste des Abréviations

AC: Activité Coagulante.

AP: Activité Protéolytique.

BSA: Sérum albumine bovine.

CMP: Caséinomacropeptide.

DAN: diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester.

DIFP: diisopropyl-phosphoro-fluoridate.

EC: Enzyme Commission.

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

EEP: Extrait enzymatique précipité.

EGTA: ethyleneglycoltetraacetic acid.

EPNP: 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane.

HCl: Acide chlorhydrique.

HCN: Cyanure d'hydrogène.

GDL: Glucono- δ -lactone.

MCA: Milk-clotting activity.

GMP: Glycomacropeptide.

PA: Proteolytic activity.

p-CMB: p-chloromercuribenzoic acid.

PDA: Potato Dextrose Agar.

pH: potentiel d'hydrogène.

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride.

rpm: rotation par minute.

SSF: Solid-State Fermentation.

UV-VIS: Ultra-Violet-Visible.

v/p: volume par poids.

v/v: volume par volume.

Liste de figures

Figure 1: Action des Aminopeptidases et carboxypeptidases sur la chaîne peptidique.....	04
Figure 2: La réaction catalysée par les Endopeptidases	04
Figure 3: Structure d'une micelle de caséines	09
Figure 4: Assemblage des sous-micelles en micelle de caséines	10
Figure 5: Les étapes de fabrication des différents types de fromage	14
Figure 6: Vue ventrale du tractus digestif du poulet	19
Figure 7: Arbuste de <i>F. carica</i> L.....	21
Figure 8: Aspect des feuilles de <i>F. carica</i> L	21
Figures 9: Latex, fruit non mûr et mûr de <i>F. carica</i> L.....	22
Figure10: Caractéristiques morphologiques typiques des champignons appartenant au genre <i>Mucor</i>	24
Figure 11: Préparation des proventricules de poulet (avant et après incision)	29
Figure 12: Méthodologie suivie pour récupérer le latex du figuier.....	29
Figure 13: Préparation de la suspension de spores de <i>M. circinelloides</i>	30
Figure 14: Extraction de la pepsine de poulet par sonication	31
Figure15: Production de la protéase fongique par <i>M. circinelloides</i> (aspect des Erlenmeyers avant et après la SSF).....	32
Figure 16: Processus d'extraction par le système d'agitation horizontale.....	32
Figure17: Aspect des produits finis obtenus par les différents extraits lyophilisés par comparaison à la présure commerciale	51
Figure 18: Aspect des fromages Camembert obtenus par l'extrait lyophilisé de la pepsine de poulet par comparaison à la présure commerciale	56
Figure 19: Le logo de notre marque	64

Liste de tableaux

Tableau I: Propriétés de quelques enzymes protéolytiques	06
Tableau II: Caractéristiques biochimiques des caséines du lait.....	09
Tableau III: Classification des fromages.....	13
Tableau IV: Préparation du mélange réactionnel et dosage de l'activité enzymatique.	36
Tableau V: Caractéristiques des extraits enzymatiques bruts de différentes origines obtenus durant l'étape d'extraction.....	42
Tableau VI: Paramètres de la pré-purification des trois extraits enzymatiques coagulant le lait...46	
Tableau VII: Résultats des analyses physicochimiques des fromages frais élaborés par les extraits pré-purifiés de différentes origines.	49
Tableau VIII: Résultats de l'analyse sensorielle des quatre échantillons de fromage frais produits.	51
Tableau IX: Rendements fromagers obtenus durant les essais de production du fromage frais par les trois extraits pré-purifiés	53
Tableau X: Résultats des analyses physicochimiques des fromages Camembert élaborés.	54
Tableau XI: Résultats de l'analyse sensorielle des échantillons de fromage Camembert obtenus.....	55
Tableau XII: Rendements obtenus pour le fromage Camembert fabriqué par l'extrait dialysé de la pepsine de poulet et la présure commerciale.....	56
Tableau XIII: Coûts du matériel de laboratoire sur une période de 10 ans	67
Tableau XIV: Coûts de verrerie et petits équipements de laboratoire pour 5 ans	67
Tableau XV: Les coûts des fournitures de bureau	68
Tableau XVI: Les frais de transport	68
Tableau XVII: Les couts des produits chimiques	68
Tableau XVIII: Autres frais	69
Tableau XIX: Le scénario optimiste	69
Tableau XX: Le scénario pessimiste	69
Tableau XXI: Le Besoin en fonds de roulement de l'entreprise	70

Tableau XXII:Le fonds de roulement de l'entreprise70
Tableau XXIII: La trésorerie de l'entreprise.....71

Introduction

Introduction

Introduction

Le processus de transformation du lait en fromage comprend trois étapes principales : la coagulation, l'égouttage et l'affinage. La coagulation du lait est l'étape clé qui est principalement influencée par la composition protéique du lait et le type de l'agent coagulant. Elle est induite par l'acidification, par l'action d'une enzyme ou par une combinaison des deux (Gengler *et al.*, 2017).

La demande croissante de fromage à l'échelle mondiale, conjuguée à l'incapacité d'augmenter simultanément la production de la présure animale, a entraîné une pénurie mondiale de ce coagulant. Cette problématique est particulièrement préoccupante dans les pays musulmans, en raison des restrictions religieuses liées aux rituels d'abattage. L'Algérie ne fait pas exception à cette situation. Selon le Bureau national des statistiques (ONS), en 2016, il est indiqué que l'Algérie utilise environ 1,5 tonne par an de présure ou de ses succédanés d'origine microbienne dans la préparation de fromages à coagulation enzymatique. Cette quantité a un coût d'environ 102 000 \$, soit environ 7,5 millions de DA (dinars algériens). De plus, l'importation de fromage en Algérie a augmenté, passant de 4 612,8 millions de DA en 2011 à 13 512,9 millions de DA (Benyahia *et al.*, 2013).

La recherche s'est tournée vers l'utilisation d'enzymes protéolytiques de différentes origines (animale, végétale et microbienne) comme substituants potentiels de la présure dans ce domaine (Souaré *et al.*, 2017). Les protéases forment un groupe de molécules enzymatiques complexes qui remplissent des fonctions de protéolyse hautement ciblée. En raison de leur spécificité accrue envers les biomolécules, les protéases sont utilisées dans de nombreux secteurs de l'industrie et de la biotechnologie. Sur le marché mondial, les protéases occupent la position la plus pertinente parmi les enzymes industrielles avec un pourcentage de 60% (Gurumallesh *et al.*, 2019).

Dans ce cadre, notre étude vise à évaluer l'application des enzymes protéolytiques provenant de différentes origines dans la fabrication de deux types de fromages, en tant que des succédanés possibles de la présure commerciale. Afin d'atteindre cet objectif, notre démarche expérimentale est structurée en plusieurs étapes:

- ✓ Extraction des enzymatiques protéolytiques, animale et végétale, à partir des proventricules de poulet et le latex de figuier.
- ✓ Production d'une protéase microbienne en utilisant la souche fongique *Mucor circinelloides* par fermentation sur milieu solide (SSF).
- ✓ Pré-purification des extraits enzymatiques bruts par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium et par dialyse.
- ✓ Évaluation de la capacité coagulante et l'activité protéolytique des différents extraits enzymatiques élaborés.
- ✓ Utilisation des extraits enzymatiques concentrés dans la fabrication de deux types de fromage, frais et Camembert, par comparaison à la présure commerciale.

La réussite de notre démarche expérimentale permet de fournir dans l'avenir des alternatives économiques à l'industrie fromagère, tout en maintenant la qualité et les propriétés souhaitées des fromages produits.

Chapitre I

Partie Bibliographique

I. Les enzymes protéolytiques

I.1. Généralités

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont connues depuis longtemps comme des enzymes qui catalysent la rupture des protéines au niveau des sites bien spécifiques en scindant les liaisons peptidiques (Da Silva, 2017). Elles sont omniprésentes dans la nature et jouent un rôle majeur dans les processus physiologiques et industriels (Rani *et al.*, 2012). Les protéases sont indispensables dans tous les organismes vivants pour la synthèse des biomolécules nécessaires et pour le contrôle de la taille, la forme, l'orientation et la composition de protéines (Gurumallesh *et al.*, 2019). La plupart de protéases sont traduites sous formes d'enzymes inactives ou zymogènes ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux. Elles constituent un groupe complexe d'enzymes qui diffèrent entre elles par leurs propriétés telles que la spécificité de substrat, la composition du site actif, le mécanisme catalytique, les optimums de pH et de température, ainsi que la stabilité et l'effet des inhibiteurs (Drouin, 2005).

I.2. Classification des protéases

Les enzymes protéolytiques appartiennent à la classe des enzymes hydrolases (EC. 3) et sont regroupées dans la sous-classe des hydrolases peptidiques ou peptidases (EC. 3.4) (Mótyán *et al.*, 2013). En raison de la variété dans leur comportement catalytique, les protéases sont difficiles à classer en suivant les règles établies pour le reste des enzymes, et au lieu de cela, trois critères sont utilisés pour leur classification : la nature chimique du site actif, le type de la réaction catalysée et l'évolution de la structure de la protéase (Feijoo-Siota *et al.*, 2011). Les protéases sont divisées en deux grands groupes selon leur site et le mode d'action en exopeptidases (EC. 3.4.11–19) et endopeptidases (EC. 3.4.21–24, 99) (Mótyán *et al.*, 2013).

I.2.1. Les exopeptidases

Les exopeptidases catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques près des extrémités N ou C-terminal du substrat, et agissent en deux formes à savoir les aminopeptidases et carboxypeptidases. Comme leur nom l'indique (**Fig.1**), les aminopeptidases libèrent un tripeptide, un dipeptide ou des acides aminés simples à partir du point N-terminal. Les terminaisons C-terminal de la chaîne protéique sont principalement hydrolysées par les carboxypeptidases. Selon le type de l'acide aminé du site actif, les carboxypeptidases sont

regroupées en trois catégories: les carboxypeptidases à sérine, à cystéines et les métallo-carboxypeptidases (Drouin, 2005).

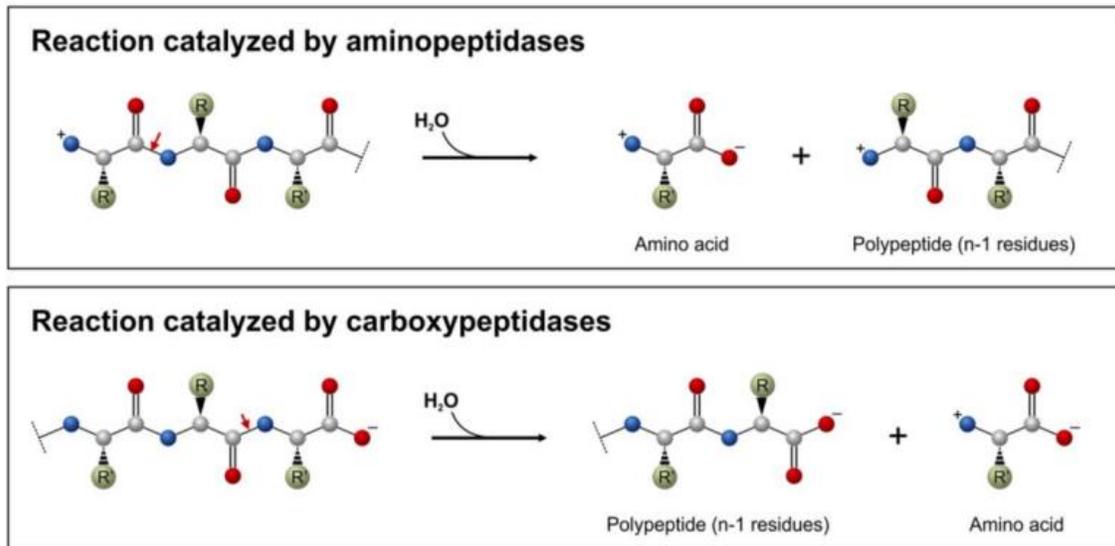


Figure 1: Action des aminopeptidases et carboxypeptidases sur la chaîne peptidique (Mótyán *et al.*, 2013).

I.2.2. Les endopeptidases

Les endopeptidases ou protéinases hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur d'une chaîne protéique, jouant un rôle proactif dans le clivage des acides aminés non terminaux (**Fig.2**) (Gurumallesh *et al.*, 2019). Les endopeptidases sont soumises à une classification qui dépend de la nature chimique de l'acide aminé du site actif responsable de l'activité catalytique (Drouin, 2005). On distingue six classes de protéinases :

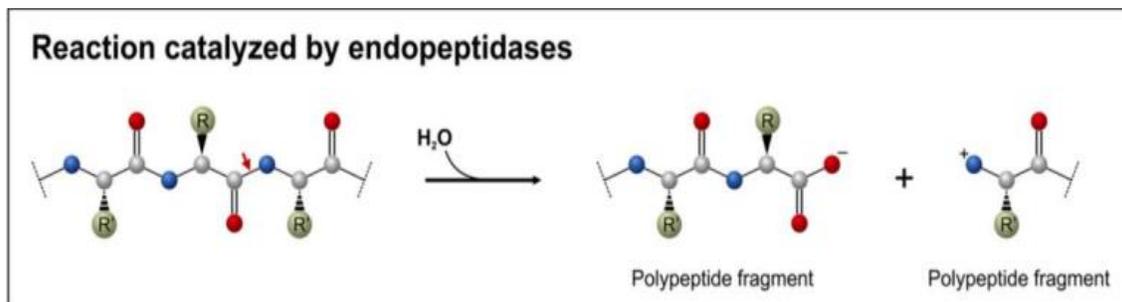


Figure 2 : La réaction catalysée par les endopeptidases (Mótyán *et al.*, 2013).

1. Protéases à sérine

Ces protéinases sont caractérisées par la présence d'un résidu de sérine dans leur site actif. Toutes les sérines protéases contiennent une triade catalytique composée de Ser, His et Asp. Les protéases à sérine sont généralement actives à pH neutre et alcalin, avec un pH optimal entre 7 et 11. Elles ont de grandes spécificités vis-à-vis le substrat (Rani *et al.*, 2012).

2. Protéases à acide aspartique

Les protéases à acide aspartique, communément appelées protéases acides, sont les endopeptidases qui dépendent de deux résidus d'acide aspartique hautement conservés pour leur activité catalytique (Gurumallesh *et al.*, 2019). La plupart des protéases aspartiques montrent une activité maximale à pH acide (pH 3 à 4) et ont des points isoélectriques compris entre 3 et 4,50 (Rani *et al.*, 2012).

3. Protéases à cystéine

Les cystéines ou thiol-peptidases sont des endopeptidases, dont l'action catalytique dépend d'un résidu de cystéine dans leur site actif. La dyade catalytique, His et Cys, est présente dans tous les thiol-peptidases. Dans certains cas, comme pour la papaïne, le site catalytique est composé généralement d'His, Cys et Asp. Les cystéines protéases ne sont actives qu'en présence d'agents réducteurs tels que l'H₂CN ou la cystéine. En général, ces enzymes montrent une activité maximale à pH 4,5–7; avec une masse moléculaire d'environ 20 à 35 kDa (Tavano *et al.*, 2018).

4. Métallo-protéases

Les métallo-peptidases sont des protéinases qui dépendent des ions métalliques divalents, généralement du Zn²⁺, pour leur activité catalytique. Le site actif consiste principalement de l'His-Glu-Xaa-Xaa-His, où Xaa est le même acide aminé répété deux fois. Le résidu His est impliqué dans l'accommodation des ions de zinc et le résidu Glu est directement lié à la fonction catalytique. Ces peptidases présentent une grande variété catalytique pour la protéolyse, comme la collagénase et l'élastase (Ward *et al.*, 2009).

5. Protéases à thréonine et à acide glutamique

Les endoprotéases à acide glutamique et à thréonine représentent de nouvelles familles d'enzymes récemment caractérisées, ayant des mécanismes de réaction qui impliquent une

participation spécifique de l'acide aminé Glu au site actif et de la thréonine, respectivement (Ward *et al.*, 2009).

Le **tableau I** présente quelques propriétés des enzymes protéolytiques appartenant aux classes de protéinases les plus abondantes.

Tableau I : Propriétés de quelques enzymes protéolytiques (Kahlouche, 2018).

Classe	Exemple	Origine	pH opt	T° opt (°C)	Inhibiteurs
Seryl-protéases	Chymotrypsine	Pancréas	8,0 – 8,5	35	PMSF, EDTA, DIFP, phénol, indole
	trypsine subtilisine	//	7,5 – 8,0	45	
		<i>B. subtilis</i>	7,4	60	
		<i>B. licheniformis</i>	10	56	
		<i>B. amyloliquefaciens</i>	10	60	
	P. extracellulaire Endopeptidase	<i>Fusarium culmorum</i> <i>Trichoderma viride</i>	8,3 – 9,6 7,0 – 8,0	50 40	
Cystéyl-protéases	Papaïne	<i>Carica papaya</i>	8,0 – 8,5	35	p-CMB, Iodoacétamide
	Ficine	<i>Ficus globrata</i>	4,0 – 6,0	35	
	Protéase neutre	<i>Geotrichum candidum</i>	7,0	42	
	Aminopeptidase	<i>Lb. helveticus</i>	7,0	37	
	Streptopain	<i>Streptococcus sp</i>	7,2	37	
	Cathepsine K	cellules animales	6,5	-	
Aspartyl-protéases	Pepsine A	Estomac de veau	1,5 – 2,5	40	Pepstatine, EPNP, DAN
	Chymosine	Cellules animales	4,0 – 4,5	40 – 42	
	Cathepsine D	<i>Trichoderma harzianum</i>	2,5 – 3,5	37	
	P. extracellulaire	<i>Aspergillus niger</i>	4,5	40	
Métalloprotéases	Carboxypeptidase A	Intestin grêle des vertébrés	7,5	37	EDTA, EGTA
	Carboxypeptidase B	<i>Micrococcus caseolyticus</i>	8,0	37	
	Collagénase	cellules animales	7,4	38	

I.3. Applications sélectionnées des protéases

Les protéases sont des enzymes largement appliquées dans plusieurs secteurs de l'industrie et de la biotechnologie (Mótyán *et al.*, 2013). En effet, elles représentent 60 à 65% du total des ventes mondiales des enzymes (Feijoo-Siota *et al.*, 2011). On cite quelques applications majeures des protéases dans le secteur industriel et pharmaceutique:

I.3.1. Industrie des détergents

Les protéases sont l'un des ingrédients standards de toutes sortes de détergents allant de ceux utilisés pour le ménage, le blanchiment aux réactifs utilisés pour le nettoyage des lentilles de contact (Rani *et al.*, 2012). Elles sont utilisées en combinaison avec autres enzymes (amylases, lipases,...) et représentent environ 35% du marché mondial des enzymes industrielles (Gurumallesh *et al.* 2019). Les protéases hautement alcalines, produites par les espèces alcalophiles de genre *Bacillus*, sont les représentant de cette catégorie de protéases (Ward *et al.*, 2009).

I.3.2. Industrie du cuir

Le traitement du cuir comporte plusieurs étapes telles que le trempage, l'écorçage et le bronzage (Rani *et al.* 2012). L'écorçage est un processus important dans l'industrie du cuir où l'utilisation de produits chimiques, comme le sulfure de sodium, entraîne divers problèmes liés à la pollution (Gurumallesh *et al.*, 2019). L'application des protéases comme une alternative aux produits chimiques a été utilisée avec succès dans l'amélioration de la qualité du cuir et pour réduire la pollution environnementale par les produits chimiques toxiques (Rani *et al.*, 2012).

I.3.3. Industrie alimentaire

Les protéases sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour l'amélioration continue de la qualité organoleptique des produits (la saveur, l'arôme, la couleur, la texture, l'apparence et la valeur nutritive) et pour modifier les propriétés fonctionnelles, telles que la coagulation, l'émulsification, la force du gel, la fixation des graisses...etc. Elles ont été couramment utilisées à des fins telles que la fabrication du fromage, la préparation d'hydrolysats de soja et l'attendrissement de la viande (Rani *et al.*, 2012).

I.3.4. Applications thérapeutiques

L'utilisation la plus évidente des enzymes protéolytiques est comme aides digestives. Les procédures thérapeutiques non invasives évoluent en grande partie dans le traitement des maladies (Rani *et al.*, 2012). Certaines enzymes sont très sélectives et spécifiques même à une très faible concentration. L'injection de certaines protéases étrangères a réduit l'inflammation et la douleur des tissus et a aidé à réduire l'inconfort du sein obstruant chez les femmes en lactation (Alipour *et al.*, 2016). Le groupe d'enzymes collagénases sont des métallo-protéinases matricielles qui peuvent être utilisées pour traiter certaines maladies comme celles de Dupuytren

et de Peyronie, la cicatrisation des plaies, les brûlures, l'hernie discale intervertébrale, la dégradation du placenta humain... etc. (Rani *et al.*, 2012).

II. Coagulation du lait

II.1. Caractéristiques du lait

Le lait est un aliment blanchâtre produit par les cellules sécrétoires mammaires des femelles durant le processus de lactation (Guetouache *et al.*, 2014). Sa composition et ses caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces de mammifères, et même selon les races et le stade de lactation pour s'adapter aux besoins (Vilain *et al.*, 2010). Le lait contient plusieurs groupes d'éléments nutritifs. Les substances organiques sont présentes en quantité à peu près égale et sont divisées en éléments constructeurs, protéines et composants énergétiques, glucides et lipides. Pour tous les animaux, l'eau est l'élément nutritif le plus nécessaire et le lait contient 88,6% d'eau. Il comprend également des éléments fonctionnels, tels que les vitamines, les enzymes, et des sels dissous, en particulier sous forme de phosphates, nitrates et chlorures de calcium, de magnésium, de potassium et de sodium. Il contient également des gaz dissous (5% en volume), principalement du dioxyde de carbone, de l'azote et de l'oxygène (Guetouache *et al.*, 2014).

II.2. Protéines du lait

Tous les laits de mammifères ont la même composition protéique de base et il y a de fortes homologies de structure entre les protéines du lait des différentes espèces (Vilain *et al.*, 2010). Les protéines du lait sont classées en deux catégories selon leur solubilité dans l'eau et leur stabilité: les protéines globulaires de lactosérum, qui sont solubles dans la phase sérique, et les caséines, qui existent dans une suspension colloïdale stable d'agrégats connus sous le nom de micelles de caséine (Horne *et al.*, 2017).

II.2.1. Caséines du lait

Les caséines forment une famille des phosphoprotéines synthétisées par les cellules épithéliales mammaires sous un contrôle multi-hormonal complexe (Léonil *et al.*, 2013). Dans le lait, elles représentent près de 80% des protéines et sont pour la plupart (90–95%) associées entre elles par différentes interactions sous la forme d'une structure sphérique appelée micelle (**Fig.3**). Les quatre principales protéines qui forment les micelles sont les caséines α_1 ; α_2 ; β et κ (Vuilleumard *et al.*, 2018). Ces micelles précipitent sous l'action de la présure ou lors d'une

acidification à un pH d'environ 4,60 (Ilboudo *et al.*, 2012). Leurs caractéristiques physicochimiques sont présentées dans le **Tableau II** (Guetouache *et al.*, 2014).

Tableau II : Caractéristiques biochimiques des caséines du lait (Guetouache *et al.*, 2014).

Paramètre	Caséine α_1	Caséine α_2	Caséine β	Caséine- κ
Résidu d'acides aminés	199	207	209	169
Poids moléculaire	23600	25200	24000	19000
Résidus de cystéine	-	2	-	2
Groupes phosphoryles	8-9	10-13	5	1-2
Glucides	-	-	-	+
Sensibilité à la Chymosine	+	-	+	++
Sensibilité au calcium	++	+++	+	-

Les micelles de caséines se présentent sous la forme de sphères, dont la distribution de la taille varie entre 30 à 300 nm, avec un diamètre moyen de 150 nm (Vuilleumard *et al.*, 2018). Une micelle est composée de 90% de caséine et de 8% de minéraux. Les quatre caséines qui la composent, α_1 , α_2 , β et κ , sont dans un rapport molaire respectif de 4:1:3,5:1,5. La fraction minérale est constituée à 90% de phosphate de calcium et à 10% d'ions magnésium et citrate (Léonil *et al.*, 2013). Plusieurs modèles représentant la structure des micelles ont été proposés, mais il semble acquis que les micelles sont formées de sous-micelles reliées les unes aux autres par des ponts phosphate de calcium (**Fig.3**) (Vuilleumard *et al.*, 2018).

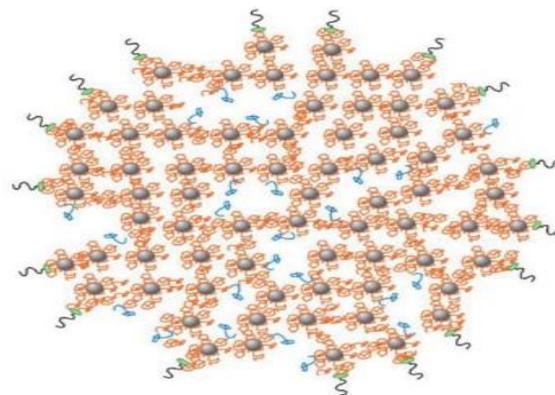


Figure 3: Structure d'une micelle de caséines (Vuilleumard *et al.*, 2018).

Les sous-micelles sont polaires en surface alors que leur centre est plus hydrophobe, formé par les régions apolaires des caséines (Vuilleumard *et al.*, 2018). Donc, il existe deux types de sub-

micelles : celles constituées de caséines α s et β au cœur de la micelle et celles constituées de caséines α s et κ . Les sous-unités riches en caséine- κ se situent préférentiellement à la surface de la micelle (**Fig.4**). La partie C-terminal hydrophile de la caséine- κ (le caséino-macropéptide) forme une couche de «chevelure» flexibles à la surface de la micelle stabilisant la structure colloïdale par répulsions électrostatiques et stériques entre les micelles en suspension (Léonil *et al.* 2013).

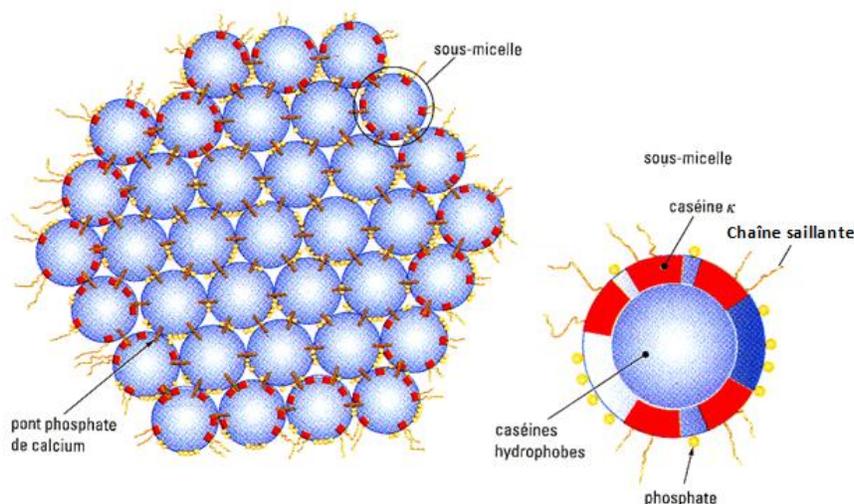


Figure 4 : Assemblage des sous-micelles en micelle de caséines (Vuilleumard *et al.*, 2018).

II.2.2. Protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum existent principalement sous forme de monomères ou de dimères qui sont repliés en arrangements tridimensionnels globulaires compacts. Elles sont sensibles à la chaleur et commencent à se dénaturer à des températures supérieures à 79°C, et elles deviennent plus thermosensibles lorsque le pH du lait est abaissé de sa valeur physiologique (environ 6,7 à 6,0) (Kindstedt *et al.*, 2014).

II.3. La coagulation du lait

La coagulation du lait est une étape clé dans la production du fromage qui est principalement influencée par la composition protéique du lait. Elle correspond à une déstabilisation des micelles de caséine, qui flocculent et s'agglomèrent pour former un gel renfermant les composants du lait solubles. La matière grasse et les caséines sont concentrées, tandis que les autres composants du lait, principalement l'eau, sont éliminés avec le lactosérum (Troch *et al.*, 2017). On distingue trois types de coagulation selon le procédé suivi:

II.3.1. Coagulation par acidification

La coagulation acide est induite par l'action des bactéries lactiques, qui fermentent le lactose en acide lactique, l'ajout direct d'acides, comme l'HCl, ou par l'utilisation de glucono- δ -lactone (GDL), qui peut être hydrolysé en acide gluconique (Li *et al.*, 2019). La coagulation des caséines dans ce cas est due à une baisse de la dissociation des groupes acides de phosphocaséinate de calcium, neutralisés par les ions H^+ libérés par l'acidification. Lorsque l'environnement est enrichi en ions H^+ , la répulsion électrostatique diminue puis disparaît. À température ambiante et à un pH de 5,20 ; les micelles commencent à s'accumuler. La floculation totale se produit lorsque le pH de la caséine atteint son point isoélectrique ($\sim 4,60$). Le caillé obtenu est non élastique et cassant, avec une porosité et une perméabilité élevée, mais une capacité de drainage limitée (Fox *et al.* 2017).

II.3.2. Coagulation par voie enzymatique

La coagulation enzymatique est une étape essentielle dans la fabrication de la plupart des fromages (75%). Des enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou encore microbienne sont ajoutées au lait pour la coagulation, où les caséines sont séparées sous forme de coagulum avec une libération du lactosérum qui en résulte (Mazorra-Manzano *et al.*, 2018).

Les enzymes d'origine animale sont représentées essentiellement par la présure de veau, d'agneau ou de chevreau et la pepsine porcine et de poulet (Ilboudo *et al.*, 2012). Les enzymes coagulantes diffèrent par la vitesse à laquelle elles continuent de dégrader les caséines après l'hydrolyse pour la formation du gel. Seules les enzymes ayant un rapport élevé entre l'activité coagulante et l'activité protéolytique générale sont considérées comme appropriées pour la fabrication du fromage. Un niveau élevé de protéolyse non spécifique peut conduire à la formation d'un gel lâche, des pertes élevées de protéines et de matières grasses, avec un rendement réduit en fromage (Horne *et al.*, 2017).

II.3.3. Coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée de la coagulation enzymatique et de l'acidification. Ce type de coagulation est utilisée pour la production des fromages frais (petit-suisse, demi-sel), de fromages à pâte molle (Camembert) et plusieurs autres types de fromage (Jeantet *et al.*, 2008).

II.4. Mécanisme de la coagulation enzymatique

La coagulation enzymatique du lait peut être divisée en trois phases :

II.4.1. Phase primaire

La chymosine attaque spécifiquement la composante qui stabilise la micelle de caséine (la caséine- κ) au niveau de la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆. Il y a alors coupure de la chaîne peptidique en deux segments inégaux (Ilboudo *et al.*, 2012). La partie N-terminal de la molécule, appelée paracaséine- κ , reste attachée à la micelle de caséine tandis que la partie C-terminal, appelée caséinomacropéptide (CMP) ou glycomacropéptide (GMP) est perdue dans le lactosérum (Fox *et al.*, 2017). Le CMP est la partie de la caséine- κ qui est fortement chargée négativement et responsable des répulsions stériques et électrostatiques. Par son action, la chymosine supprime cette chevelure stabilisante de la micelle (Ilboudo *et al.*, 2012).

II.4.2. Phase secondaire

C'est une étape de mécanisme d'agglomération encore mal connu. Lors de cette phase, les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes par intervention des ions calcium qui s'unissent à la partie chargée négativement des micelles, diminuant ainsi les forces de répulsion électrostatiques auxquelles elles sont soumises, ce qui favorise leur agrégation. Cette phase est marquée par la formation du gel. Le démarrage de cette phase nécessite qu'au moins 85 à 90% de la caséine- κ soit hydrolysé. Le CMP se détache de la caséine- κ et la micelle perd son caractère hydrophile. Il y a diminution de son degré d'hydratation et de son potentiel de surface. Des liaisons hydrophobes et électrostatiques s'établissent alors entre les micelles modifiées et vont entraîner la formation du gel (Ilboudo *et al.*, 2012).

II.4.3. Phase tertiaire

Les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations par la mise en place de liaisons phosphocalciques et peut-être des ponts disulfures entre les paracaséines. Ces mécanismes survenant au cours des phases (2 et 3) sont assez complexes et encore mal connus (Ilboudo *et al.*, 2012).

III. Fromage

III.1. Définition

Le fromage est un produit connu et élaboré par l'homme depuis des millénaires (Gillis *et al.*, 2018). C'est le nom générique d'un groupe de produits alimentaires fermentés à base du lait, affinés ou non, produits dans un large éventail de saveurs et de formes à travers le monde (Fox et

McSweeney, 2017). La transformation du lait en fromage répond au besoin de conservation des principaux constituants du lait (Gillis *et al.*, 2018). La composition des fromages varie en fonction de leurs éléments nutritifs comme les protéines, les lipides, les glucides, les minéraux, le calcium, le phosphore et les vitamines A et B. Ils jouent un rôle important dans la nutrition des personnes de tous âges et ils sont l'un des meilleurs produits alimentaires (Cruz *et al.*, 2011).

III.2. Classification des fromages

Le critère le plus courant pour le classement est la texture (très dure, dure, semi dure, semi-molle, molle), qui est principalement liée à la teneur en humidité du fromage, le type du lait, la méthode de coagulation, la température de cuisson, la composition du fromage et les agents d'affinage caractéristiques (Fox et McSweeney, 2017). Donc, on peut dire qu'il y a huit classes de fromages : extra durs, à pâte pilée, à pâte dure, à pâte ferme, à pâte molle moisie intérieurement, à pâte molle et croûte lavée, à pâte molle et croûte moisie, à pâte fraîche (Gîncul *et al.*, 2010). Le tableau suivant représente certaines propriétés de quelques classes de fromages.

Tableau III: Classification des fromages (Gîncul *et al.*, 2010).

Types	Caractéristiques	Exemples
Fromages à pâte fraîche	Fromages qui doivent être consommés rapidement, sont affinage.	Fromages blancs, Petits-Suisses, Demi-sel, etc.
Fromages à pâte molle	Fermentation initiale puissante, affinage prolongé, souvent recouverts de moisissures blanches. Le caillé est directement moulé, légèrement découpé ou bien découpé.	Camembert
Fromages à pâte ferme	Pâte renfermant moins d'eau et plus de sels minéraux (calcium).	Gouda, Cheddar, Tomme
Fromages à pâte persillée appelés parfois : « Les Romantiques »	Moisissures à pores bleus dans la pâte.	Bleus, Gorgonzola, Stilton, etc.
Fromages fondus	Ils sont obtenus avec des fragments de fromage à pâte ferme et d'autres.	Kiri

III.3. Principales étapes de fabrication du fromage

Le principe de base de la fabrication du fromage soit le même pour tous les types de fromage mais le processus de fabrication diffère selon le type (Khanal *et al.*, 2019). Les étapes de la transformation du lait en fromages sont la préparation du lait, la coagulation (acide, présure, ou mixte), l'égouttage, le salage et l'affinage (**Fig.5**). Des actions thermiques et mécaniques spécifiques à certaines technologies peuvent également être utilisées (Lopez *et al.*, 2010).

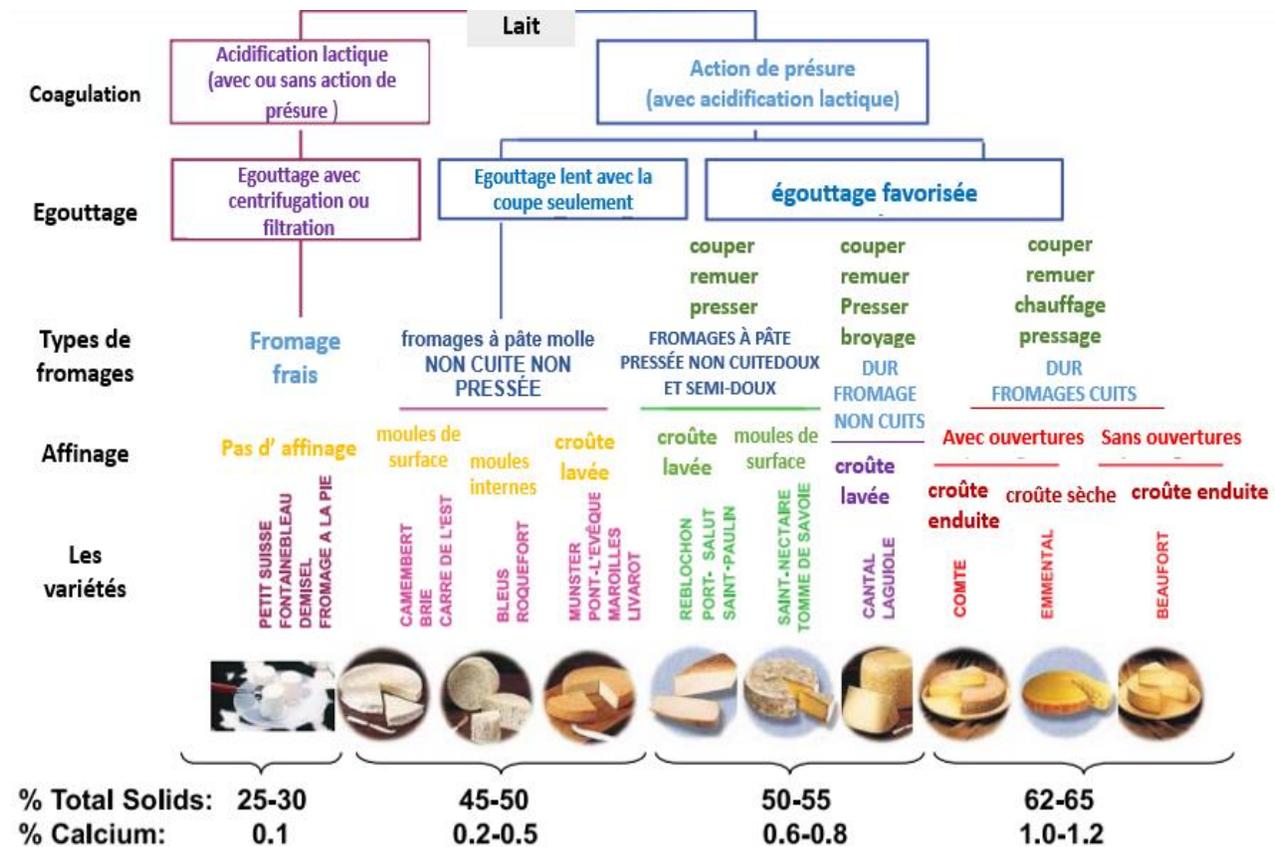


Figure 5 : Les étapes de fabrication des différents types de fromage (Almena-Aliste *et al.*, 2014).

III.3.1. Préparation du lait

La qualité et le type du lait influencent directement la qualité du fromage. Il est évident que le lait provenant de différents animaux contient différents pourcentages de matières grasses et de protéines. Le rapport matière grasse/protéine du lait, la teneur en calcium et le pH du lait sont des facteurs importants pour déterminer la qualité du fromage. Ces trois paramètres peuvent être modifiés en fonction des besoins et du type de fromage à produire (Khanal *et al.*, 2019).

Le lait utilisé pour la fabrication des fromages peut être cru, traité thermiquement plus ou moins intensément, homogénéisé ou non, standardisé en matière grasse et/ou en matière

protéique. Le lait peut également subir une maturation biologique (Lopez *et al.*, 2010). Après l'analyse du lait, ce dernier est filtré ou centrifugé pour éliminer les particules en suspension. La pasteurisation du lait est effectuée pour tuer tous les micro-organismes pathogènes et nocifs et pour inactiver les enzymes phosphatase et xanthine oxydase présentes dans le lait.

Selon le type du fromage, des additifs sont ajoutés avant la maturation du lait, notamment des colorants et des sels (chlorure de calcium et nitrate de sodium). Les ferments (lactiques et/ou d'affinage) sont ajoutés à raison de 0,05 à 4% selon le type du ferment et la préférence du fabricant (Khanal *et al.*, 2019).

III.3.2. La coagulation

La coagulation du lait, peut être réalisée soit par acidification, par l'ajout d'une enzyme ou par voie mixte (Freitas *et al.*, 2013). La plupart des fromagers choisissent un pH optimal pour l'ajout de la présure afin de coaguler le lait, car le pH régit la nature et la vitesse de formation du caillé (Khanal *et al.*, 2019). Une fois la coagulation requise est obtenue, le caillé est coupé à l'aide de couteaux ou de fils, dont le temps de coupe du coagulum varie entre 25 min et 2 h selon le procédé et la recette. La taille des particules de caillé est principalement déterminée par le temps et la vitesse de coupe et varie en fonction du type de fromage (Freitas *et al.*, 2013). Le processus de coagulation doit être bref, rentable et bien contrôlé et ne doit pas entraîner une perte excessive du caillé et de la matière grasse dans le lactosérum (Khanal *et al.*, 2019). La synthèse du caillé et l'élimination du lactosérum qui s'ensuit varient en fonction du type de fromage :

- Le caillé peut être maintenu dans le lactosérum pendant une courte période avant d'être transféré directement dans des moules à fromage et égoutté, comme dans le cas des fromages affinés à pâte molle (Camembert).
- Il peut être brassé dans le lactosérum pendant une période plus longue, associée à une étape de cuisson ou d'échaudage (pour les variétés Cheddar et Swiss).
- Le lactosérum est partiellement remplacé par de l'eau chaude pour obtenir une température de 35-37°C, comme pour le fromage Gouda et l'Edam (Freitas *et al.*, 2011).

III.3.3. Egouttage

Il est nécessaire de séparer les particules de caillé du lactosérum libre qui les entoure pour former le fromage. Le mélange du caillé et de lactosérum est versé dans le récipient d'égouttage

(avec mousseline au fond), tel qu'un tamis en céramique ou un panier en osier. Le petit-lait s'écoule alors progressivement à travers les perforations du tamis ou du panier, laissant derrière lui une couche de caillé. L'égouttage diffère du trempage en ce sens que le caillé reste dans la cuve utilisée pour la coagulation et la cuisson, et que le lactosérum est évacué par une vanne munie d'une crépine pour retenir le caillé. Dans la pratique industrielle, le caillé et le lactosérum sont également pompés de la cuve vers une table d'égouttage munie d'une base perforée qui draine le lactosérum et retient le caillé (Kindstedt *et al.*, 2014). Après l'égouttage, le caillé est ensuite soumis à des étapes de fabrication supplémentaires (par exemple, cheddarisation, étirement, moulage, pressage et salage) qui sont plus ou moins spécifiques à chaque variété (Bintsis *et al.*, 2017).

III.3.4. Le salage

Le salage du fromage est une étape essentielle dans la transformation du produit (Cruz *et al.*, 2011). La concentration du sel dans le fromage varie en fonction de la méthode d'application. Elle varie également en fonction du type de fromage; par exemple, pour le Cheddar 1,7%, l'Emmental 0,05%, le Gouda 2%, le Bleu 4% et le Feta 7% (Khanal *et al.*, 2019). Il influence l'activité enzymatique pendant la maturation et les espèces microbiennes qui ont un impact final sur la saveur. D'autres fonctions du sel comprennent l'amélioration de la texture, l'inactivation et/ou la réduction des bactéries responsables de la détérioration de plusieurs fromages affinés saumurés, ainsi que l'induction de la synérèse du caillé (Cruz *et al.*, 2011). Il existe trois méthodes de salage :

- L'immersion dans la saumure dans laquelle le produit est immergée dans une solution du NaCl à une concentration prédéterminée et est appliqué aux types de fromage tels que l'Edam, Gouda, Provolone et Swiss.
- Salaison sèche dans laquelle des cristaux de sel sont directement ajoutés au gel formé avant son moulage et/ou pressage, en particulier appliqué sur le cheddar et Stilton.
- Salage sec à la surface, qui consiste à ajouter du sel à la surface du fromage moulé et qui est appliqué aux fromages tels que le bleu (Cruz *et al.* 2011).

III.3.5. L'affinage

L'affinage est le processus par lequel le fromage non affiné ou "frais" est transformé ou "mûri" pour atteindre sa pleine maturité. Il nécessite une combinaison spécifique de conditions environnementales (température, humidité, environnement physique, présence d'une microflore indigène spécifique, etc.) et de manipulations physiques (frotter, gratter, tourner, laver, etc.) qui sont effectuées par le fabricant (Kindstedt *et al.*, 2014). Le fromage est stocké à une température et une humidité relative prédéterminées pendant une période variable (Freitas *et al.*, 2013). La durée d'affinage peut être des semaines, des mois ou des années selon les fromages (Kindstedt *et al.*, 2014).

La qualité organoleptique finale du fromage est déterminée par les changements physiques et chimiques qui se produisent pendant la maturation. Les réactions biochimiques primaires de l'affinage du fromage, qui conduisent au développement de l'arôme et de la texture du fromage, comprennent principalement la glycolyse, la protéolyse et la lipolyse. En outre, les réactions secondaires, telles que la déphosphorylation des protéines et le métabolisme des acides aminés, sont importantes.

- La glycolyse consiste à convertir le lactose en acide lactique par le biais des cultures starters et le catabolisme de l'acide lactique et du citrate en d'autres composés sous l'action des cultures secondaires d'affinage ;
- La protéolyse consiste à hydrolyser les caséines en peptides par le biais des endopeptidases et la transformation des peptides libérés en acides aminés sous l'action des exopeptidases ;
- La lipolyse consiste à hydrolyser les triacylglycérols, di- et monoacylglycérols en acides gras libres par le biais des lipases et des estérases provenant de diverses sources (à partir du lait natif et/ou des cultures secondaires ajoutées) (Freitas *et al.*, 2013).

IV. Sources de protéases exploitées

Les enzymes sont de plus en plus utilisées dans le monde industriel à cause de leurs nombreuses propriétés intéressantes. Au cours de notre travail, nous avons exploité trois sources différentes de protéases : animale (pepsine de poulet), végétale (le latex du figuier ; *Ficus carica*) et microbienne (protéase fongique de *Mucor circinelloides*).

IV.1. Source animale

Les enzymes coagulantes d'origine animale sont produites au niveau du tube digestif. Elles sont responsables de la digestion des protéines alimentaires par hydrolyse des liaisons peptidiques. Elles sont sécrétées sous formes inactives (proenzymes ou zymogènes) puis elles deviennent actives sous l'action de l'acide gastrique (Kahlouche, 2018). Les extraits animaux sont principalement constitués de trois enzymes, appartenant à la famille de *Pepsin-Like* des protéinases aspartiques : chymosine (EC.3.4.23.4), pepsine A (EC.3.4.23.1) et gastricsine (EC.3.4.23.3). La proportion de ces enzymes dépend du régime alimentaire et de l'âge de l'animal à l'abattage (Corredig et Salvatore, 2016). Plusieurs protéases d'origine animale sont utilisées pour la fabrication des fromages. La trypsine et la chymotrypsine entraînent des modifications profondes des modalités de fabrication et de la qualité des produits finis dues à la forte activité protéolytique (Kahlouche, 2018).

La pepsine est l'une des protéases d'origine animale qui ont été expérimentées pour une utilisation potentielle dans l'industrie fromagère comme substituants de la présure. La pepsine de poulet est connue dans le sud d'Algérie depuis une époque lointaine et est utilisée dans la fabrication du fromage traditionnel connu comme "Takammérit" (Benyahia-Krid *et al.*, 2017). Elle est nommée pepsine C, extraite de proventricule de poulet (*Gallus gallus*), qui est situé légèrement à gauche dans la cavité abdominale (**Fig.6**). Il correspond à un renflement fusiforme (de 3 cm de long en moyenne chez la poule) dont la muqueuse est très riche en glandes à mucus. La paroi interne, très épaisse, est formée de lobules dont chacun constitue une glande (Bachir et Rahmouni, 2011). Les glandes de type tubulaire ont des orifices formant des rangées de mamelons visibles à l'œil nu. Les alvéoles de ces glandes sont bordées de cellules spécialisées oxyntico-peptiques sécrétant à la fois de l'acide chlorhydrique et une proenzyme protéolytique : le pepsinogène (Alamareot, 1982).

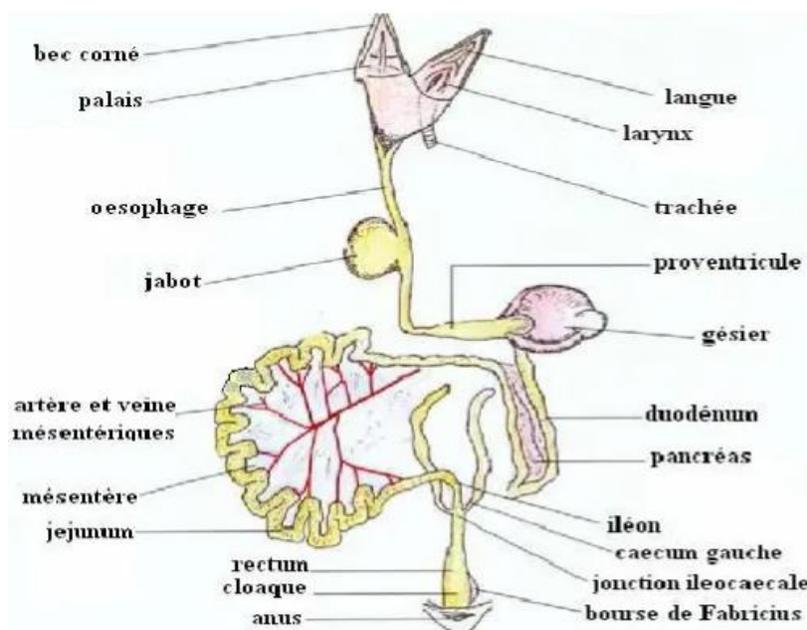


Figure 6 : Vue ventrale du tractus digestif du poulet (Bachir et Rahmouni, 2011).

Le pepsinogène du poulet est composé de 387 acides aminés avec un poids moléculaire de 43 kDa. Alors que la pepsine est composée de 308 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 35 kDa. Le pH optimum de la pepsine de poulet est de 2.80, reste stable à pH 8 et devient complètement inactive à pH 8,50 (Bohak, 1969).

Certains succédanés d'origine animale comme la pepsine de poulet peuvent être considérés comme des produits de remplacement acceptables de la présure de veau, mais elle attaque plus rapidement la caséine- α s par comparaison à la présure (Talantikite, 2015). En outre de l'utilisation de pepsine pour cailler le lait pendant la fabrication du fromage, elle est également employée pour une variété d'applications dans la fabrication alimentaire : pour faire des céréales précuites en céréales instantanées chaudes et pour enlever les poils et les tissus résiduels des peaux dans l'industrie de la cire (Benyahia-Krid *et al.*, 2017).

IV.2. Source végétale

Ficus carica Linn est l'une des cinq plantes mentionnées dans le Coran (Alamgeer *et al.*, 2017). Cette espèce diploïde ($2n=26$) de la famille des Moracées (Guasmi *et al.*, 2006) est un arbre originaire du sud-ouest de l'Asie et de la Méditerranée orientale (Mawa *et al.*, 2013). Les conditions favorables à la croissance sont un faible taux d'humidité (inférieur à 25%), le rayonnement solaire intense, les températures estivales élevées (environ 32 à 37°C) et les hivers modérés (avec des températures supérieures à 1°C) (Crisosto *et al.*, 2011).

F. carica est cultivé depuis longtemps dans différents endroits du monde pour ses fruits comestibles (Mawa *et al.*, 2013). Chaque année, plus d'un million de tonnes de figues fraîches sont récoltées dans le monde. L'Algérie produit 12,54% de la récolte mondiale de figues (Mahmoudi *et al.*, 2018). Elle est classée la troisième parmi les principaux pays producteurs de figues dans le monde, après la Turquie et l'Égypte. La majeure partie de la production de figuiers algériens provient de régions montagneuses (Bejaia, Tizi Ouzou et Sétif), où elle est considérée comme la culture fruitière la plus importante après l'olive (Boudchicha *et al.*, 2018).

Le latex de *F. carica* est encore utilisé aujourd'hui dans la production du fromage artisanal (Lomolino *et al.*, 2015) et du yaourt pour améliorer l'activité probiotique, également dans l'industrie des boissons et en boulangerie (Rasool *et al.*, 2023).

IV.2.1. Classification et systématique

Le genre *Ficus* est l'un des plus grands genres d'angiospermes et comprend un nombre de 600 à 2000 espèces (Crisosto *et al.*, 2011; Giordano *et al.*, 2020). D'après Badgujar *et al.* (2014), la classification botanique de *F. carica* est comme suivant :

Règne : Plantae – Plantes
Division : Magnoliophyta – Plantes à fleurs
Classe : Magnoliopsida – Dicotylédones
Ordre : Urticales
Famille : Moraceae
Genre : *Ficus*
Espèce : *F. carica* Linn

IV.2.2. Description botanique

F. carica est un arbre à feuilles caduques d'environ 3 à 6 m de hauteur avec de nombreuses branches étalées et un tronc souvent tortueux. Ses racines sont abondantes, étroites et généralement peu profondes. Son bois est mou et condensé (**Fig.7**) (Crisosto *et al.*, 2011; Badgujar *et al.*, 2014).



Figure 7: Arbuste de *F. carica* L. (Mcgovern *et al.*, 2002).

Les feuilles de la plante sont vertes, simples, alternes et grandes. Elles sont plus ou moins profondément lobées avec 1 à 5 sinus, rugueux sur la surface supérieure et poilus doux sur la face inférieure (**Fig.8**) (Badgujar *et al.*, 2014).



Figure 8: Aspect des feuilles de *F. carica* (Face supérieure et inférieure) (Badgujar *et al.*, 2014).

Les fleurs sont unisexuées, minuscules, étroitement groupées sur la face interne d'un grand réceptacle creux, extérieurement en forme de poire, soutenu à la base par plusieurs bractées larges, lisses et écailleuses, et perforé à l'apex par un orifice fermé par de nombreuses petites écailles (Salma *et al.*, 2020). La partie supérieure du réceptacle est occupée par des fleurs femelles et la partie inférieure par des fleurs mâles (Badgujar *et al.*, 2014).

Le fruit de la figue est issu d'une inflorescence complexe appelée sycone, qui renferme des centaines de fruits (Crisosto *et al.*, 2011). Les graines peuvent être tardives, moyennes, petites ou minuscules et leur nombre varie de 30 à 1600 par fruit. Les graines comestibles sont nombreuses et généralement creuses, sauf si elles sont pollinisées. La « figue » mûre a une pelure dure (verte

pure, verte avec brun, brun ou violet), se fissure souvent et expose la pulpe en dessous (**Fig.9**) (Badgujar *et al.*, 2014).



Figures 9: Latex, fruit non mûr et mûr de *F. carialis* (Michel, 2015; Salma *et al.*, 2020).

Toutes les parties de la plante (rameaux, feuilles, fruits) contiennent un latex irritant. Le latex de la plante est blanc laiteux et contient principalement la Ficin, qui est une enzyme protéolytique (**Fig.9**) (Badgujar *et al.*, 2014).

IV.3. Source microbienne

Les microorganismes représentent une excellente source de protéases produites par une grande variété de bactéries et des champignons. Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial. Les champignons filamenteux ont une capacité extraordinaire de sécréter des protéines fonctionnellement actives (Ward *et al.*, 2009).

Le genre *Mucor* appartient à l'ordre le plus important des Mucorales, un groupe phylogénétiquement ancien de champignons appartenant aux « premiers champignons divergents ». Depuis la première observation microscopique d'un spécimen de *Mucor* en 1665 jusqu'à maintenant, plusieurs centaines d'espèces potentielles de *Mucor* ont été signalées. Les *Mucor* spp. sont communes et principalement saprotrophes. Ces micro-organismes omniprésents peuvent coloniser des environnements multiples (Lebreton *et al.*, 2020). La plupart des espèces *Mucor* vivent sur des matières végétales ou animales en décomposition mais aussi dans le sol (Talantikite *et al.*, 2015).

Leurs spores asexuées, habituellement dispersées par le vent, se développent dans les sporanges à l'extrémité des hyphes aériens. Les hyphes des *Mucor* sont généralement siphonnés et larges avec un diamètre pouvant atteindre 15 μm . La reproduction sexuée produit des zygotes durs, entourés par une paroi épaisse appelés zygosporés; qui restent dormants,

quand l'environnement est trop défavorable pour la croissance (Talantikite *et al.*, 2015). Les spores de *Mucor* possèdent une grande capacité d'absorption d'humidité, d'adhérence à diverses surfaces et de dispersion dans l'air humide. Si elles trouvent un substrat propice, elles ont la capacité de germer rapidement dans leur environnement (Lebreton *et al.*, 2020).

IV.3.1. Classification

Le genre *Mucor* fait partie du règne des mycètes (fungi), division des Amastigomycota, classe des Zygomycètes, ordre des Mucorales, famille des *Mucoraceae*. Les genres *Rhizopus*, *Absidia* et plusieurs autres sont inclus dans cette famille. La différenciation entre les espèces du genre *Mucor* sp. se base sur la couleur, l'aspect, la vitesse d'envahissement,...etc. Le genre *Mucor* comprend différentes espèces et parmi ces espèces beaucoup sont rencontrées dans les fromages (presque 30 espèces), dont certaines sont beaucoup plus fréquentes que d'autres (Morin-Sardin *et al.*, 2017).

IV.3.2. Les caractéristiques morphologiques

En général, les familles et les taxons de Mucorales se distinguent les uns des autres par la morphologie des structures reproductrices asexuées, en particulier les caractéristiques des sporangiophores, des sporanges, des columelles et des sporangiospores. La famille des *Mucoraceae*, qui comprend *Mucor*, est caractérisée par des sporanges multi-spores avec des columelles. En outre, les rhizoïdes et les stolons sont soit très réduits ou complètement absents chez les membres de cette famille. Les arthrospores sont formés dans des conditions nutritionnelles ou environnementales défavorables par la septification d'hyphes normalement cœnocytiqes, suivie par la fragmentation des hyphes (**Fig.10**) (Botha et Botes, 2014).

M. circinelloides est un champignon dimorphique non pathogène qui peut se présenter sous deux formes, moisissure et levure. Il est ubiquitaire et transmis par voie asexuée avec deux types de sporangiospores ; ramifié et allongé. Les sporanges les plus grands, blancs et changent graduellement leur couleur au brun verdâtre, font partie des sporangiospores allongés. Ils sont de forme globulaire avec une taille de 40–80 µm ; appelés «têtes flottantes» (Fazili *et al.*, 2022).

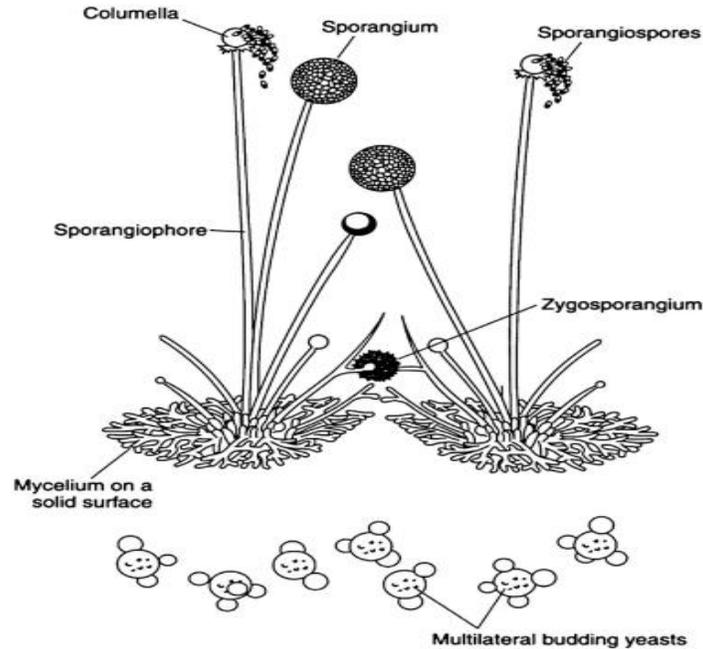


Figure 10: Caractéristiques morphologiques typiques des champignons appartenant au genre *Mucor* (Botha et Botes, 2014).

IV.3.3. Applications de *M. circinelloides*

M. circinelloides est considéré comme une « usine de cellules microbiennes » en raison de sa capacité à produire plusieurs enzymes (Fazili *et al.*, 2022). Il est utilisé dans la fabrication de différents types de fromage pour lui donner sa saveur caractéristique, la texture et la couleur jaune-brun (Metin *et al.*, 2018). Il est fréquemment rencontré en industrie agroalimentaire où certaines souches peuvent contribuer positivement au développement des qualités organoleptiques et nutritionnelles de nombreux produits fermentés et aussi pour l'étude de l'accumulation de lipides et est considéré comme un organisme exemplaire pour la génération d'acides gras et d'autres composés bioactifs essentiels (Fazili *et al.*, 2022).

V. La présure

La présure de veau est composée de 80 % de chymosine et 20% de pepsine, c'est la plus ancienne enzyme de coagulation du lait. Elle est toujours la plus largement utilisée dans les procédures de fabrication de fromage. Les propriétés coagulantes de la présure de veau sont principalement dues à la chymosine, une protéase aspartique considérée comme le meilleur agent de coagulation en raison de sa haute spécificité pour le clivage de la K -caséine de la liaison peptidique Phe 105- Met 106 (kumar *et al.*, 2006 ; Kurutahalli *et al.* 2010 ; Esposito *et al.*, 2016).

V.1. Origine et dénomination

La présure de veau est la préparation coagulante traditionnelle la plus utilisée pour la coagulation du lait (Alais, 1984 ; Wigley, 1996). De faibles quantités sont obtenues à partir de l'estomac de chevreau et d'agneau. La dénomination présure est réservée à l'extrait coagulant provenant de la quatrième poche de l'estomac de veau de lait appelée abomasum ou caillette. Elle renferme deux enzymes actives. La chymosine est la protéase majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale le complément est apporté par la pepsine. On observe les plus fortes teneurs en chymosine chez les animaux non sevrés ; dès que la ration alimentaire renferme des aliments solides et que le jeune animal commence à brouter, la proportion de chymosine chute très fortement ; à l'inverse, la pepsine devient dominante et caractérise la sécrétion stomacale du mammifère adulte (Garg *et al*, 1993).

V.2. Composition de la présure

V.2.1. Chymosine

La chymosine est la protéase majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale (Ramet, 1997). Elle est synthétisée sous forme de prochymosine, activée sous l'action du suc gastrique acide. Elle subit alors une conversion en chymosine active. La chymosine C'est une holoprotéine de 35,6 kDa, appartenant au groupe des protéases acides (pH optimal entre 4 et 5), stable à pH 5,3 – 6,3, inactivée à 7,5, dénaturée à 8. Sa température optimale d'action est voisine de 40°C. l'inactivation thermique a lieu à 50° C, elle est totale à 61° C (Lenoir *et al.*, 1985 ; Scriban, 1999).

La chymosine bovine est une protéine globulaire constituée de 323 résidus et présentant une homologie de séquence de 55% avec pepsine. La chymosine de veau naturelle se trouve sous trois isoformes : A, B et C. La différence entre A et les formes B sont liées à un acide aminé différent résidu en position 243 de la chaîne moléculaire, qui est un Asp sous la forme A et un Gly dans le B forme (Chitpinyol et Crabbe, 1998). La Chymosine C apparait comme étant un produit de dégradation de la Chymosine A (Danley et Geoghegan, 1988).

V.2.2.Pepsine

La pepsine est le constituant mineur de la présure dont la sécrétion gastrique ne devient prépondérante qu'après sevrage (Ramet, 1997). Elle est produite sous forme d'un précurseur inactif, le pepsinogène. La forme pepsine active est obtenu par acidification, la pepsine à un poids moléculaire de 35 kDa (Alais, 1984). La pepsine est une protéase acide qui se trouve dans

l'estomac de la quasi-totalité des vertébrés ; elle présente une activité optimale entre pH 1 et 2, tandis que le pH optimal de l'estomac est de 2 à 4. La pepsine est inactivée au-delà de pH 6,0. L'enzyme catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques entre deux acides aminés hydrophobes. (Rao et al., 1998) A l'opposé de la chymosine, la pepsine possède une activité protéolytique élevée et une faible activité coagulante. Bien que la pepsine puisse coaguler le lait, elle a tendance à être associée à des pertes de matière grasse plus importantes au cours de la fabrication du fromage (Garg *et al.*, 1993).

La pepsine est relativement stable à des pH compris entre 5 et 5,5. Son activité enzymatique est plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat. C'est une enzyme thermosensible en solution au-delà d'une température de 55°C. Elle est dénaturée par des températures de 70°C (Graiday, 1978). Les pepsinogènes sont synthétisés dans la muqueuse gastrique et convertis par autocatalysation en leur forme active correspondante dans l'environnement acide du suc gastrique, en libérant les segments d'activation du NH₂-terminal. Jusqu'à présent, cinq groupes de pepsinogènes ont été classés, à savoir les pepsinogènes A, B et F, la progastricine (ou propepsine C) et la prochymosine, principalement présentes dans le suc gastrique des mammifères fœtaux et nouveau-nés (Kageyama, 2002). Les pepsines ont en commun, la propriété de cliver les substrats protéiques, tels que l'hémoglobine dénaturée, l'albumine sérique et les oligopeptides appropriés, dans des conditions de pH acide (Wu *et al.*, 2009)

V.3.Succédanés de présure

La production de fromage a connu une augmentation considérable d'environ 3,5 fois depuis 1961. Cependant, l'approvisionnement en présure a diminué en raison de divers facteurs, notamment la disponibilité limitée des estomacs de ruminants. Des éléments tels que le coût élevé de la présure, des considérations religieuses (comme l'islam et le judaïsme), des régimes alimentaires végétariens, ainsi que l'interdiction de l'utilisation de présure de veau recombinante dans certains pays comme la France, l'Allemagne et les Pays-Bas ont encouragé la recherche de sources alternatives d'enzymes de coagulation du lait. De plus, l'extraction et la purification de la présure de veau impliquent plusieurs étapes et opérations, ce qui rend l'approvisionnement en enzymes coagulantes coûteux et laborieux (Puglisi et al., 2013). Étant donné l'expansion de la production de fromage à l'échelle mondiale, la quête de substituts s'est intensifiée (Merheb-Dini *et al.*, 2010).

La recherche s'est principalement concentrée sur le développement d'enzymes coagulantes pouvant remplacer la présure de veau dans le processus de fabrication du fromage. Ces alternatives incluent des enzymes d'origine microbienne, végétale, animale et même des enzymes recombinantes obtenues grâce à la biotechnologie (Shah *et al.*, 2014).

Chapitre II

Matériel & Méthodes

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de Biochimie, Département de Biologie, Faculté SNV-ST (Université de Bouira), ainsi qu'au niveau de l'entreprise Faiz-lait et Produits Laitiers (Corso, Wilaya de Boumerdes) durant la période 23/05/2023 jusqu'à 23/06/2023. Les objectifs de notre étude s'articulent autour des points suivants:

- ✓ Déterminer le pouvoir coagulant des enzymes extraites de proventricules de poulet, du latex de figuier et produites par la souche fongique *M. circinelloides*.
- ✓ Evaluer la capacité de ces enzymes à coaguler le lait de vache dans le but de produire le fromage frais et camembert, par comparaison à la présure commerciale.

I. Matériel

I.1. Matériel non biologique

Les produits chimiques, les appareils ainsi que la verrerie utilisée au cours de nos expériences au niveau des deux laboratoires sont indiqués dans l'Annexe 1.

I.2. Matériel biologique

Le matériel biologique exploité durant notre étude correspond au:

- Proventricules du système digestif de poulet.
- Latex de figuier (*F. carica* L.).
- La souche fongique *M. circinelloides*.

I.2.1. Préparation des proventricules

Les proventricules sont obtenus à partir d'une boucherie Tallab située dans la région d'Ain Bessam (Wilaya de Bouira). Après l'abattage et l'éviscération des poulets, les proventricules sont séparés du tube digestif par une incision au niveau de la partie supérieure, qui est reliée au jabot, et au niveau du col inférieur, qui est relié au gésier. Les proventricules de poulet, pesant environ 60g, sont ensuite réfrigérés et transportés vers le laboratoire. A l'arrivée, ils sont immédiatement ouverts par une incision longitudinale et vidés des particules alimentaires qui adhèrent aux parois. Après rinçage à l'eau courante, la matière grasse qui recouvre les proventricules a été entièrement éliminée. Les proventricules sont ensuite conservés à -18°C jusqu'à leur utilisation ultérieure (Fig. 11).



Figure 11 : préparation des proventricules de poulet (avant et après incision).

I.2.2. Récupération du latex de figuier

Le latex du figuier est un liquide légèrement visqueux de couleur blanche qui s'écoule des feuilles et des fruits lorsqu'ils sont séparés des tiges ou lorsque de jeunes rameaux sont brisés. Il est composé de caoutchouc, de résine, d'albumine, de sucre, d'acide malique, d'enzymes protéolytiques diastase, estérase, lipase, de catalase et de peroxydase (Joseph *et al.* 2011).

Ce latex a été récolté dans la région de Bouira vers la fin du mois d'Avril 2023 (**Fig. 12**). Dans le but de caractériser l'extrait enzymatique du latex, ce dernier a été conservé dans des tubes à essai propres jusqu'à l'utilisation.



Figure 12: Méthodologie suivie pour récupérer le latex de figuier.

I.2.3. Préparation de la souche fongique

La souche utilisée dans cette étude est *M. circinelloides*. Elle est maintenue en survie sur milieu PDA incliné en tubes (voir composition Annexe 2). La revivification de la souche a été réalisée sur le même milieu en boîtes de Pétri, par ensemencement avec quelques fragments mycéliens. Les boîtes ont été incubées par la suite pendant 5 à 7 jours à $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

La récupération des spores, dans le but de préparer l'inoculum, a été réalisée en ajoutant une solution stérile de Tween 80 à 0,1% (v/v) dans chaque boîte de Pétri (Agrawal et al., 2005) (Fig. 13). Les spores fongiques sont mises en suspension par un grattage léger de la surface de gélose avec une anse de platine. Une filtration sur papier filtre stérile assure l'élimination des débris de mycélium (hyphes) et de milieu (gélose). 1 mL de la suspension contenant environ $12,6 \times 10^7$ spores/mL, déterminé à l'aide d'un spectrophotomètre à 600 nm, a été utilisé comme inoculum.



Figure 13: Préparation de la suspension de spores de *M. circinelloides*.

II. Méthodes

II.1. Extraction de la pepsine de poulet

Pour l'extraction, nous avons commencé en premier lieu par la décongélation des proventricules à température ambiante (20 à 25°C). Ensuite, les proventricules ont été hachés dans un hachoir à viande avec une vitesse de 5000 tours par min pendant 10 secondes. Une quantité de 40 g de proventricules hachés a été introduite dans un Erlenmeyer de 250 mL, puis additionnée d'eau distillée utilisée comme le solvant d'extraction (1:3 ; p/v). La pepsine de poulet

a été extraite ensuite par sonication à 4°C pendant 3 h, en utilisant une fréquence constante de 40 kHz (Fig. 14) (Bensmail et al., 2017).



Figure 14: Extraction de la pepsine de poulet par sonication.

Après filtration de l'extrait obtenu sur une gaze, l'activation de l'enzyme récupérée (la pepsinogène) a été réalisée en abaissant le pH du filtrat par l'HCl 3 N jusqu'à pH 2 pendant 15 min. Par la suite, le pH a été ajusté de nouveau à 6,40 en utilisant une solution de soude (NaOH 1 N). Une centrifugation à 9000 rpm pendant 30 min a été effectuée dans le but d'éliminer les débris restants. Le surnageant ainsi obtenu a été conservé à 4°C jusqu'à son utilisation ultérieure.

II.2. Extraction de la ficine

Le latex décongelé de *F. carica* a été mélangé avec le tampon phosphate de potassium 0,1M; pH=5,5 (1:3 ; v/v) contenant de l'EDTA à 5 mM (voir préparation Annexe 2). Le mélange obtenu a été centrifugé à 9000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant récupéré à l'aide d'une micropipette a été conservé à 4°C jusqu'à dosage (Bensmail et al., 2022a).

II.3. Production de la protéase fongique par SSF

Dans des Erlenmeyers de 250 mL, nous avons introduit 10 g de son de blé avec 0,1 g de sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$), puis humidifié le mélange avec 10 mL de la solution saline M-9 (pH 4,23) ayant la composition suivante (g/L): NaH_2PO_4 12,8 ; KH_2PO_4 3 ; NaCl 0,5 ; NH_4Cl 1 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 (Tunga et al., 1998). Les Erlenmeyers ont été ensuite bouchés avec du coton cardé et coiffés avec du papier aluminium, pour les préparer à la stérilisation (121°C pendant 20 min). Après refroidissement, chaque milieu a été inoculé avec

1mL de la suspension fongique, distribué de manière homogène sur le substrat, puis incubés à 25°C pendant 72h (Fig. 15) (Bensmail et al., 2019).



Figure 15: Production de la protéase fongique par *M. circinelloides* (aspect des Erlenmeyers avant et après la SSF).

À la fin de la fermentation, nous avons procédé à l'extraction de la protéase fongique à partir des milieux fermentés, en ajoutant le tampon citrate/phosphate de sodium pH 4 (1:5 p/v) (voir préparation Annexe 2). Après agitation à 250 rpm pendant 3 h à 20°C (Fig. 16), le mélange a été filtré à travers une gaze, puis le filtrat a été centrifugé à 9000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant récupéré constitue l'extrait enzymatique brut (Bensmail et al., 2022b).



Figure 16: Processus d'extraction par le système d'agitation horizontale.

II.4. Essai de pré-purification

II.4.1. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

- **Principe**

Cette technique consiste à ajouter du sulfate d'ammonium à une solution protéique, ce qui entraîne la déshydratation et la neutralisation des protéines. En conséquence, cela provoque le phénomène de relargage salin, qui permet aux protéines de conserver leur conformation native et peuvent être dissoutes de nouveau sans dénaturation (Burgess, 2009).

- **Mode opératoire**

Les trois extraits enzymatiques bruts ainsi obtenus ont été soumis à une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium avec des taux de saturation bien définis: 20-70% pour l'extrait enzymatique de *M. circinelloides* (Bensmail *et al.*, 2019), un taux de 50% et de 70% pour les extraits bruts de pepsine et de ficine, respectivement (Bensmail *et al.*, 2017; 2022a). La quantité en sel nécessaire pour atteindre le taux de saturation désiré a été calculée selon l'équation (1). Cette étape a été conduite sous agitation douce à 4°C, dont les quantités pesées ont été ajoutées graduellement pour chaque extrait.

$$m \text{ (g)} = \frac{515(X-X_0)}{100-0,27X} \text{ (à } 0 - 4^\circ\text{C)} \dots\dots\dots(1) \text{ (Bollag } et al., 1996)$$

Où :

m: masse de (NH₄)₂SO₄ à ajouter pour 1 L de solution;

X: taux de saturation à atteindre;

X₀: taux de saturation initiale.

Après avoir laissé les solutions enzymatiques saturées pour décanter pendant 18 h à 4°C, nous avons procédé à une centrifugation à 9000 rpm pendant 20 min. Le culot contenant la ficine a été re-suspendu dans un volume faible du tampon phosphate de potassium (0,1 M; pH 5,5), alors ceux de la pepsine et de *M. circinelloides* ont été solubilisés dans le tampon citrate/phosphate de sodium (0,1 M) à pH 5,2 et 4, respectivement. Tous les extraits enzymatiques récupérés ont été soumis à une dialyse dans le but d'éliminer le sel résiduel.

II.4.2. Dialyse

- **Principe**

La dialyse est une méthode de séparation qui permet l'élimination des ions ou des petites molécules d'une solution macromoléculaire, en les faisant passer à travers une membrane agissant comme un tamis moléculaire (Hamrani, 2008).

- **Mode opératoire**

Une fois la précipitation par le sulfate d'ammonium est achevée, nous avons procédé à la dialyse des culots récupérés et solubilisés dans des volumes minimums du tampon adéquat. Pour cela, nous avons utilisé une membrane semi-perméable avec un *Cut Off* de 12-14 kDa (diamètre de pores). Après la préparation des boudins, et l'introduction des extraits précipités, la dialyse a été conduite pendant 24 h à 4°C et sous faible agitation contre le tampon adéquat, en le renouvelant chaque 2 h afin d'accélérer la sortie du sel. La dernière dialyse a été réalisée pendant toute la nuit sans renouvellement.

II.4.3. Lyophilisation

C'est la dernière étape après la dialyse. C'est une méthode de concentration et de conservation des produits par déshydratation, qui implique la sublimation de la glace. Cela signifie que l'eau passe directement de l'état solide à l'état gazeux sans passer par l'état liquide (Hamrani, 2008). Les extraits dialysés ont été concentrés et déshydratés suite à une étape de lyophilisation conduite pendant 24 h à 4°C.

II.5. Méthodes de dosage

Après chaque expérience (extraction, précipitation différentielle et lyophilisation), trois méthodes de dosage ont été réalisées. Toutes les manipulations ont été effectuées en triplicata et les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type.

II.5.1. Détermination de l'activité coagulante (AC)

L'activité coagulante est déterminée par mesure du temps de floculation selon la méthode d'Arima *et al.* (1970). Le temps de floculation est l'intervalle de temps compris entre le moment de l'emprésurage et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu.

La méthode consiste à ajouter 1 mL de l'extrait enzymatique à 10 mL d'un substrat standard pré-incubé à 35°C pendant 15 min. Ce substrat était préparé en dissolvant la poudre du

lait écrémé à 10% (p/v) dans une solution de CaCl₂ (0,01 M), puis en ajustant le pH à 6,40 avec une solution de NaOH 0,1 N et/ou HCl 0,1 N.

L'activité coagulante a été exprimée en force coagulante de Soxhlet, qui correspond au nombre d'unités de poids ou de volume du lait coagulable en 40 min à 35°C par unité de poids ou de volume de la préparation enzymatique, selon la relation suivante :

$$F \text{ (US/mL)} = \frac{2400 \times V_1}{T \times V_2}$$

V₁: volume du lait à coaguler;

V₂: volume de la solution enzymatique;

T: temps de coagulation du lait exprimé en secondes.

II.5.2. Dosage des protéines

- **Principe**

La concentration en protéines des extraits enzymatiques a été déterminée selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode se base sur la liaison du colorant Bleu Brilliant de Coomassie G250 à la protéine. À faible pH, le colorant libre présente une absorption maximale à 470 et 650 nm, mais lorsqu'il est lié à une protéine, son pic d'absorption se déplace à 595 nm.

- **Mode opératoire**

Pour déterminer la concentration en protéines des extraits enzymatiques, une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant des dilutions allant de 0 à 100 µg/µL, préparées à partir d'une solution mère de BSA (sérum albumine bovine) à 1 mg/mL (voir **Annexe 3**). Les échantillons ont été traités de la même manière que la courbe d'étalonnage, où 100 µL de chaque extrait ont été mélangés avec 3 mL du réactif de Bradford (voir préparation **Annexe 2**). Après incubation pendant 5 à 10 min à l'abri de la lumière, l'absorbance a été lue à 595 nm contre le blanc contenant le même volume de l'eau distillée.

II.5.3. Mesure de l'activité protéolytique (AP)

Cette mesure est effectuée selon la méthode décrite par Anson (1938). L'objectif de la mesure de cette activité est l'évaluation du taux de dégradation de la caséine (substrat) par l'extrait enzymatique et d'évaluer le rapport AC/AP. L'addition du TCA dans le milieu réactionnel arrête la réaction et une centrifugation permet de séparer le précipité de caséine (culot) et le produit d'hydrolyse (surnageant) solubilisé dans le TCA. Le dosage de l'hydrolysate

dans le surnageant (des peptides) est réalisé selon la méthode préconisée par Lowry *et al.* (1951).

Les résultats s'expriment en terme de concentration de tyrosine en $\mu\text{g/mL}$ d'extrait enzymatique par référence à un courbe étalon établi à partir de concentrations croissantes en tyrosine varient de 20 à 100 $\mu\text{g/mL}$ (voir **Annexe 3**). Pour l'étude de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques, la manipulation a été réalisée en deux étapes: la réaction enzymatique (action de l'enzyme sur le substrat qui est la caséine) et le dosage de l'activité en mesurant la quantité des produits formés (**Tableau VI**).

Tableau IV: Préparation du mélange réactionnel et dosage de l'activité enzymatique.

Numéro de tube	Blanc	1	2
Solutions			
Extrait enzymatique (mL)	-	0,5	0,5
Solution de caséine à 2,5% dans le tampon (mL)	2,5		
Vol de Tampon (mL)	1	0,5	0,5
Bien mélanger et placer au bain marie à 40°C pendant 30 min			
TCA 4% (mL)	5		
Centrifugation (9000 rpm, 10 min)			
Le filtrat constitue la solution contenant les produits de la réaction			
Produit de la réaction	Blanc F1	Filtrat 1	Filtrat 2
Vol prélevé (mL)	1	1	1
Tampon citrate P de Na (mL)	1	1	1
Na ₂ CO ₃ à 2% (p/v)	2,5		
Agiter correctement puis laisser stabiliser le mélange pendant 10min			
Réactif de Folin dilué	0,5		
Mélanger de nouveau rapidement et énergiquement après chaque addition du réactif de Folin et laisser reposer à l'ombre pendant 30 min			
A (750 nm)	0	?	?

II.6. Fabrication du fromage

Dans chaque essai, un volume de 4,4 L du lait de vache a été utilisé pour la fabrication du fromage frais. Le lait utilisé dans chaque essai a été collecté dans la région de Boumerdes. De plus, des volumes différents d'extraits enzymatiques lyophilisés ont été utilisés pour les essais que nous avons entrepris.

II.6.1. Fromage frais

Le fromage frais se caractérise par une texture douce, crémeuse et humide. Il est généralement fabriqué à partir du lait de vache, de chèvre ou de brebis, non affiné, et il est souvent consommé rapidement après sa fabrication, sans subir un processus de vieillissement prolongé. La méthode de fabrication du fromage frais peut varier, mais elle implique généralement la coagulation du lait à l'aide d'un agent coagulant, suivi de l'égouttage du petit-lait pour obtenir une consistance plus épaisse (Coulon et Desachy, 2019).

II.6.1.1 Processus de fabrication du fromage frais

Le fromage frais est fabriqué avec du lait de vache pasteurisé (4,4 L) à 90°C pendant quelques minutes, puis refroidi rapidement jusqu'à 36-38°C, par la suite 1,76 mL de CaCl₂ (36%, p/v) a été ajouté pour améliorer le processus de coagulation.

Le processus de fabrication de ce fromage comprend une étape de coagulation totale qui se produit après 25 à 40 min, grâce à l'acidification du lait causée par l'action des ferments lactiques ajoutés à raison de 0,2 g avec l'addition de 0,025% de présure (CHY-MAX Plus, Chr. Hansen, France, 190-200 IMCU/mL), d'extrait coagulant de *M. circinelloides* et de pepsine de poulet, avec 0,029% d'extrait enzymatique de *F. carica*. Chaque enzyme a une activité coagulante spécifique.

Le fromage est ensuite découpé, légèrement brassé et égoutté pendant une période prolongée de 4 heures dans des moules recouverts de toiles. Après cette étape, nous avons mélangé le fromage égoutté à l'aide d'un mixeur. Les différents échantillons du fromage obtenus ont été conditionnés dans des boîtes recouvertes de papier cellophane, ce qui garantit une conservation jusqu'à 15 jours à 4°C.

II.6.2. Fromage à pâte molle type Camembert

Les fromages tels que le Camembert, le cheddar, le brie et le gruyère sont définis par le *Codex Alimentarius* et peuvent être fabriqués dans le monde entier. Le Camembert est un fromage à pâte molle qui subit un affinage en surface, principalement grâce à des moisissures. Il est généralement présenté sous la forme d'un cylindre plat pesant entre 80 g et 500 g (Laurent, 2015), avec un diamètre compris entre 10 et 11 cm et une épaisseur d'environ 3 cm. Ces fromages contiennent au moins 40% de matière grasse et leur teneur en matière sèche est d'environ 110 g (Bouterfa, 2020).

Pour ce type de fromage, nous avons appliqué uniquement l'extrait lyophilisé de la pepsine de poulet sur la base des résultats obtenus lors de la fabrication du fromage frais, en le comparant à la présure commerciale. Car les résultats ont démontré que le fromage fabriqué avec la pepsine de poulet présente une similitude remarquable avec celui fabriqué avec la présure. Cette décision découle de la proximité organoleptique, incluant le goût et la texture, ainsi que de la préférence sensorielle des dégustateurs envers le produit obtenu avec la pepsine de poulet

1. Pasteurisation

Le lait récolté a subi une étape de pasteurisation à 80°C pendant quelques minutes. Ce traitement permet de réduire la flore normale présente dans le lait et d'éliminer les micro-organismes pathogènes. Ensuite, le lait a été refroidi rapidement jusqu'à une température de 36-38°C.

2. Maturation et ensemencement

La maturation du lait consiste à entreposer le lait dans des conditions spécifiques, telles qu'une température de 37°C et une humidité de $90 \pm 2\%$. Pendant cette période, les ferments lactiques se développent, favorisant la reproduction des souches de bactéries lactiques inoculées. Cette maturation est essentielle pour permettre un développement adéquat des ferments. Des souches fongiques, telles que *Penicillium camemberti*, *Penicillium caciculum* et *Geotrichum candidum*, sont également introduites pour jouer un rôle dans le processus de maturation (Bouterfa, 2020).

Cette étape consiste à enrichir le lait déjà pasteurisé par :

- 0,07 g des ferments lactiques (mésophiles et thermophile).
- 0,04 g de *P. camemberti* et 0,14 g de *G. candidum*
- 2 mL de chlorure de calcium (36%, p/v) pour 5 L.

3. emprésurage–Coagulation

Cette étape est réalisée lorsque le pH du lait atteint environ 6,40 et que la température est de 38°C pour la présure et de 36°C pour l'extrait de pepsine. Un volume correspond à 0,02% des deux extraits de présure et de la pepsine de poulet lyophilisée a été ajouté à 5 L du lait, suivi

d'une agitation pendant 1 min. Après 25 à 40 min, nous obtenons une coagulation caractérisée par un caillé blanc ferme et homogène.

4. Tranchage et soutirage de lactosérum

Les caillés obtenus ont été coupés verticalement et horizontalement en petits morceaux à l'aide d'un couteau, afin de faciliter l'évacuation du lactosérum.

5. Le moulage-égouttage

Durant cette étape, le caillé a été versé manuellement dans des moules de formes arrondies, qui ont été laissés par la suite pour égoutter pendant une nuit, ce qui permet d'éliminer davantage de lactosérum et de donner au camembert sa forme caractéristique.

6. Le salage

Le lendemain de la fabrication, nous avons démoulé les camemberts et saupoudré du sel sur les deux côtés du fromage pour ajouter de la saveur et favoriser la conservation.

7. L'affinage

C'est la dernière phase dans le processus de fabrication où nous avons placé les échantillons du Camembert produits dans des conditions spécifiques de température contrôlée (8–13°C) et d'humidité (80–90%) pendant une durée de 13 jours. Pendant cette période d'affinage, le camembert va développer son goût, sa texture et ses arômes caractéristiques. Durant l'affinage, nous avons procédé à des retournements quotidiens du fromage afin d'obtenir une croûte homogène.

II.6.3. Analyses physicochimiques

Les analyses physico-chimiques visent à évaluer les différentes caractéristiques et paramètres du produit fini tels que le pH, la teneur en matière grasse (MG) et l'extrait sec total (EST).

II.6.3.1. Mesure du pH

Cette méthode décrit la mesure électrométrique du pH qui est spécifiquement appliquée aux fromages. Son principe repose sur la mesure directe du pH (AFNOR, 1993).

- **Mode opératoire**

L'opération consistait à insérer directement une électrode préalablement étalonnée dans le produit fini. Nous avons ajusté le correcteur de température du pH-mètre à la température du produit, puis nous avons lu directement la valeur du pH affichée.

II.6.3.2. Détermination de l'extrait sec totale (EST)

- **Principe**

La méthode repose sur la dessiccation du fromage en faisant évaporer l'eau à une température de 80°C. Une quantité précise de fromage est soumise à ce processus de séchage, et la quantité de matière sèche obtenue est exprimée en pourcentage de la masse totale (AFNOR, 1993).

- **Mode opératoire**

3 à 5 g de fromage à analyser ont été pesés puis placés dans une étuve réglée à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ selon les norme de AFNOR 1993. Le séchage a été réalisé jusqu'à poids constant déterminé après refroidissement dans un dessiccateur en verre. La teneur en humidité (H) est déterminée selon l'équation suivante, dont l'estimation de ce taux assure la détermination de l'extrait sec total (EST).

$$H (\%) = (P1+P2)-P3/P2$$

Avec :

P1 : Poids du creuset vide ;

P2 : Poids d'échantillon

P3 : Poids final après séchage.

$$EST (\%) = (100 - H) \times 100$$

II.6.3.3. Mesure de la teneur en matières grasses

- **Principe**

La méthode utilisée pour séparer la matière grasse du fromage est la centrifugation. Pour favoriser cette séparation, une petite quantité d'alcool iso-amylque est ajoutée. La teneur en matière grasse est ensuite déterminée en effectuant une lecture directe sur l'échelle du butyromètre (AFNOR, 1993).

- **Mode opératoire**

3 g de l'échantillon de fromage ont été introduits dans un récipient en verre préalablement taré. Ce dernier a été placé dans la panse du butyromètre et le bouchon a été fixé au col. Ensuite, de l'acide sulfurique a été ajouté par l'ouverture de la tige jusqu'à ce que le niveau d'acide dépasse le gobelet d'environ 2 mm. Une fois l'ouverture de la tige est fermée, le butyromètre a été placé dans un bain marie maintenu à une température de 65°C. De temps en temps, le butyromètre a été agité horizontalement jusqu'à ce que l'échantillon soit complètement dissous. 1 mL d'alcool iso-amylque ont été ajouté, puis l'acide sulfurique a été complété jusqu'à atteindre la marque de 35 mL sur la graduation du butyromètre. Le butyromètre a été agité énergiquement dans un agitateur vortex pour homogénéiser le liquide. Ensuite, il a été remplacé dans le bain d'eau pendant 5 min. Après une centrifugation de 10 min, le butyromètre a été retiré de la centrifugeuse et remis dans le bain marie pendant 1 heure. Enfin, la teneur en matière grasse a été obtenue en effectuant une lecture directe sur la graduation du butyromètre.

II.6.5. Analyse sensorielle

Les tests sensoriels peuvent être classés de différentes manières, notamment par les experts en analyse sensorielle et les chercheurs en alimentation. Ils les divisent en tests axés sur le consommateur (affectif) ou axés sur le produit (analytique), en fonction de l'objectif recherché. Les tests axés sur le consommateur ont pour but d'évaluer les préférences, le niveau d'acceptation ou le goût perçu par les consommateurs pour les produits alimentaires. Quant aux tests axés sur le produit, ils sont utilisés pour déterminer les différences entre les produits ou mesurer les caractéristiques sensorielles (Siar *et al.*, 2017).

Dans le cadre de notre étude, nous avons réalisé des analyses sensorielles pour évaluer les effets de la substitution de la présure, l'agent coagulant traditionnel en fromagerie, par les extraits enzymatiques étudiés (ficine, pepsine de poulet et la présure de *Mucor*) et pour déterminer le niveau d'acceptabilité du nouveau produit par les consommateurs, en prenant en compte les critères suivants: l'aspect, la texture, l'odeur et le goût. Les détails de la fiche d'évaluation sensorielle utilisée sont précisés dans l'**Annexe 4**.

Chapitre III

Résultats et Discussion

I. Résultats et discussion

I.1. Propriétés enzymatiques des extraits bruts

Les résultats d'évaluation des différents paramètres enzymatiques et biochimiques des extraits bruts de proventricules de poulet, latex de figuier et de l'extrait produit par *M. circinelloides* sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau V: Caractéristiques des extraits enzymatiques bruts de différentes origines obtenus durant l'étape d'extraction.

Source	Proventricules de poulet	<i>M. circinelloides</i>	Latex de figuier
Paramètre			
Protéines (mg/mL)	0,79 ± 0,064	3,651 ± 0	4,273 ± 0,17
AC (US/mL)	973,333 ± 23,09	1533,333 ± 57,73	4260,651 ± 43,40
AP (µg/min/mL)	27,177 ± 6,56	147,063 ± 10,85	118,34 ± 4,26
Rapport AC/AP	35,814	10,426	36,003

AC : activité coagulante, AP : activité protéolytique.

I.1.1. Activité coagulante

La détermination de l'activité coagulante des extraits enzymatiques est un paramètre essentiel en technologie fromagère. Les données illustrées dans le **Tableau V** indiquent que l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés varie de 973,333 ± 23,09 à 4260,651 ± 43,40 (US/mL). L'extrait enzymatique brut de la ficine exerce l'activité coagulante la plus élevée par rapport à l'extrait de pepsine et celui de *M. circinelloides*.

L'extrait enzymatique brut du latex de figuier présente l'activité la plus élevée de l'ordre de 4260,651 US/mL. Nos résultats sont plus faibles à ceux rapportés par Nouani (2009) (333330 US/mL) et Siar *et al.* (2014) (26908,88 US/mL) pour la ficine extraite du latex de *Ficus carica L.*

Cette différence dans les résultats peut être attribuée à plusieurs facteurs, tels que la variabilité génétique des plantes, les caractéristiques du sol, les pratiques agronomiques, le climat et le niveau d'ensoleillement. Tous ces éléments peuvent influencer la production d'enzymes dans le latex du figuier et conduire à des variations dans son activité coagulante.

L'extrait brut de la pepsine de poulet présente une activité coagulante de 973,333 US/mL. En comparaison avec d'autres études, il est indiqué que certains ont obtenu des activités

coagulantes plus élevées, telles que 13346,66 US/mL par Krid *et al.* (2013), 2962,22 US/mL par Hamrani (2008) et 3350 US/mL par Zidoune et Adoui (2007). D'un autre côté, il est également intéressant de noter que l'activité coagulante de l'extrait de pepsine de poulet est supérieure à celle rapportée par Boughellout et Zidoune (2008), qui était de 537,77 US/mL.

Il convient de noter que ces variations dans les valeurs d'activité coagulante peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, tels que les différentes sources de pepsine, les conditions de production et de mesure, ainsi que les méthodologies utilisées dans chaque étude.

L'extrait brut du *M. circinelloides* présente une activité coagulante de 1533,333 US/mL. Cette valeur est similaire à celle rapportée par Sathya *et al.* (2009), qui était de 1568,66 US/mL. En revanche, elle est supérieure à celle rapportée par Talantikite *et al.* (2015) pour *M. pusillus* (592,66 US/mL) et Nouani *et al.* (2011) (75,55 US/mL) pour la même espèce. Par comparaison à d'autres types de champignons, l'extrait du *M. circinelloides* montre également une activité coagulante supérieure à celle de *Rhizomucor miehei*, rapportée par Aljammas *et al.* (2018) à 600 US/mL et de *M. miehei* signalée par Araújo *et al.* (2015) à 384 US/mL.

En comparant les trois extraits obtenus durant notre étude, on déduit que l'extrait brut d'origine végétale exprime une activité coagulante plus élevée par rapport les autres extraits d'origine animale et microbienne. Cela suggère que la ficine pourrait être plus efficace en termes de coagulation par rapport aux autres enzymes étudiées.

I.1.2. Activité protéolytique

L'activité protéolytique des enzymes coagulantes est un critère crucial pour leur utilisation dans l'industrie fromagère. Cette capacité des enzymes, qu'elles proviennent d'origine animale, végétale ou microbienne, à hydrolyser la caséine- κ est essentielle pour provoquer la coagulation du lait lors du processus de fabrication du fromage. Les enzymes protéolytiques présentes dans le fromage continuent à dégrader les peptides et les protéines du lait en acides aminés durant l'étape d'affinage. Cette dégradation des protéines contribue à l'évolution de la saveur, de l'apparence et de la texture du fromage (Nouani, 2009).

Les résultats obtenus indiquent que l'activité protéolytique de l'extrait brut de *M. circinelloides* ($147,063 \pm 10,85$ $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}$) est plus élevée que celle de la ficine ($118,34 \pm 4,26$ $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}$) et de pepsine de poulet ($27,177 \pm 6,56$ $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}$).

Cette forte activité protéolytique du *M. circinelloides* a été signalée par plusieurs auteurs tels qu'Alais (1984), Preetha et Boopathy (1997) et Krause *et al.* (1998), qui est probablement due à l'action non spécifique de la protéase fongique envers les autres fractions de caséines présentes dans le lait, en particulier les caséines α_s et la caséine- β .

L'activité protéolytique de l'extrait brut du latex de *F. carica* déterminée durant notre démarche expérimentale est inférieure à celle déterminée par Siar *et al.* (2020) (469,7 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}$).

Concernant la pepsine de poulet, nous avons obtenu une activité protéolytique de 27,177 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}$. Ce résultat a été confirmé par plusieurs auteurs (Alais, 1984; Preetha et Boopathy, 1997; Krause *et al.*, 1998) qui ont signalé que les protéases d'origine animale exercent une faible activité protéolytique par comparaison aux protéases végétales et microbiennes.

En général, les coagulants utilisés dans l'industrie fromagère doivent présenter une activité protéolytique limitée, c'est-à-dire que le coagulant ne doit pas provoquer une dégradation excessive des protéines du lait, la limite spécifique pour la dégradation des caséines k, afin de ne pas affecter de manière disproportionnée toutes les protéines présentes dans le lait au cours de l'affinage. Cela permet de préserver les caractéristiques organoleptiques des fromages. En effet, une activité protéolytique trop puissante peut entraîner des défauts de goût et de texture indésirables. Par conséquent, il est important que les coagulants utilisés maintiennent un équilibre approprié entre la coagulation de la caséine et la préservation des qualités sensorielles du fromage (Hamrani, 2008).

I.1.3. Teneur en protéine

Les résultats de la présente étude montrent que la teneur en protéine des extraits enzymatique étudiés varie de $0,79 \pm 0,064$ mg/mL pour la pepsine à $4,273 \pm 0,17$ mg/mL pour le l'extrait brut de ficine, qui est considéré comme l'extrait le plus riche en protéines.

Le taux en protéines dans l'extrait de ficine obtenu dans cette étude est inférieur à ceux obtenus par Siar *et al.* (2014) et Williams *et al.* (1968), qui ont publié des taux en protéines de l'ordre de 88,31 mg/mL et 156 mg/mL, respectivement. Il est également inférieur à celui obtenu par Devaraj *et al.* (2008) pour la ficine extraite du latex de *F. racemosa* qui est de 156 mg/mL.

Ce paramètre lié aux caractères apparents de la sève brute affecte les propriétés sensorielles des fromages frais qui manifestent une odeur et une amertume très prononcée. Cette conclusion a été rapportée dans les travaux de Douag Née Tirichine, (2011).

La teneur en protéines de l'extrait brut de pepsine de poulet obtenue dans cette étude est de 0,79 mg/mL. Ce résultat est nettement inférieur à celui obtenu par Nouani *et al.* (2011) (147,3 mg/mL), Zidoune et Adoui (2007) (8,77 mg/mL), Saidi et Touahria (2021) (18 mg/m), Bouras et Aïssaoui-Zitoun (2022) (20 mg/mL) et par Krid *et al.* (2013) (35,40 mg/mL).

En ce qui concerne l'extrait brut de *M. circinelloides*, nous avons obtenu une teneur en protéines de 3,65 mg/mL. Cette valeur est supérieure aux résultats signalés par Talantikite (2015) (4,27 mg/mL) et par Nouani (2009) ($2,47 \pm 0,13$ mg/mL).

I.1.4. Rapport AC/AP

En effet, le rapport AC/AP (activité coagulante/activité protéolytique) est un indicateur important pour évaluer la qualité des enzymes coagulantes. Dans notre cas, le rapport AC/AP le plus élevé est constaté pour l'extrait brut de ficine (36,003) et la pepsine de poulet (35,814), qui sont presque identique. Cela indique également que ces enzymes sont bien adaptées à la formation du caillé et peuvent contribuer à la fermeté souhaitée du fromage sans causer de goûts amers indésirables.

D'autre part, l'extrait brut de *M. circinelloides* présente un rapport AC/AP plus bas de 10,426 ; ce qui reflète une activité protéolytique relativement plus importante. Cela peut signifier que l'extrait fongique est moins adapté à la coagulation du lait et peut avoir une influence plus importante sur la dégradation des protéines du lait, qui va affecter la fermeté et les caractéristiques sensorielles du fromage produit en utilisant cet extrait enzymatique.

En résumé, un rapport AC/AP élevé indique une bonne capacité à coaguler le lait avec une libération limitée de protéines et d'arômes indésirables. Cependant, il est important de noter que d'autres facteurs, tels que les conditions de traitement et l'interaction avec d'autres composants du lait, peuvent également influencer les caractéristiques finales du fromage (Boumediene, 2021).

I.2. Essai de pré-purification des extraits bruts

Les enzymes coagulantes des trois extraits bruts ont été précipitées avec du sulfate d'ammonium en utilisant différents taux de saturation. Les précipités obtenus ont été re-

suspendus dans des volumes réduits de tampons spécifiques à différents pH. Après une étape de dialyse, les extraits élaborés ont été concentrés par lyophilisation. Les différents paramètres de purification ont été calculés en mesurant les activités enzymatiques et la concentration en protéines à chaque étape de purification (Tableau VI) afin d'évaluer la procédure suivie.

D'après les résultats détaillés dans le tableau VI, à part l'extrait de pepsine de poulet, on constate une diminution de l'activité coagulante totale en passant de l'extrait brut à l'extrait lyophilisé, qui peut être attribuée à des pertes en enzymes. Par contre, l'activité spécifique a été améliorée au cours du processus de pré-purification, sauf dans le cas des extraits précipités de *M. circinelloides* et le latex de figuier, où on note une diminution spécifique, qui a été augmentée de nouveau dans le cas de l'extrait lyophilisé pour dépasser celle de l'extrait brut concernant l'extrait de pepsine de poulet et celui de ficine. Cette augmentation de l'activité spécifique est attribuée à la réduction de la teneur en protéines totales dans l'extrait lyophilisé, ce qui augmente la concentration d'activité enzymatique par unité de masse.

Tableau VI: Paramètres de la pré-purification des trois extraits enzymatiques coagulant le lait.

Paramètre de purification	AC totale (US)	Protéine totales (mg)	AS (US/mg)	F	R (%)	Rapport AC/AP
Pepsine de poulet						
Extrait brut	88573,303	71,89	1232,067	1	100	35,814
Extrait précipité	112765	59,62	1891,395	1,535	127,312	49,246
Extrait lyophilisé	126857,142	30,07	4218,741	3,421	143,222	173,712
<i>M. circinelloides</i>						
Extrait brut	63633,32	151,545	4119,897	1	100	10,43
Extrait précipité	21252,02	20,898	1016,879	2,421	33,40	18,016
Extrait lyophilisé	11950,62	7,041	1697,242	4,042	18,78	41,552
Latex de figuier						
Extrait brut	91603,99	91,87	997,11	1	100	36,003
Extrait précipité	36319,386	52,584	690,70	0,70	39,65	15,32
Extrait lyophilisé	19786,228	8,277	2390,30	2,40	21,60	37,86

AC: activité coagulante, **AS**: activité spécifique, **F**: facteur de purification, **R**: rendement de purification. AS=AC totale/protéines totales, F=AS de l'étape X/AS de l'étape initiale, R(%)=AC totale de l'étape X/AC totale de l'étape initiale.

De même, nous avons noté une diminution progressive de la teneur en protéines tout au long des étapes de purification. Le taux en protéines éliminées correspond à 58,172% ; 95,35% et 91%, pour l'extrait de pepsine de poulet, de *M. circinelloides* et le latex de figuier, respectivement, ce qui a assuré l'amélioration de l'activité spécifique et le facteur de purification.

La teneur en protéines éliminées a été plus élevée dans le cas de l'extrait lyophilisé de *M. circinelloides* probablement due au type de précipitation différentielle effectuée et qui a été conduite en deux étapes successives (0-20% de saturation, ensuite 20-70% de saturation) contrairement aux autres extraits.

Le facteur de purification est en relation directe avec l'activité spécifique des extraits. Ce facteur a été amélioré faiblement au cours de l'essai de pré-purification. Le facteur de purification le plus élevé a été noté pour l'extrait lyophilisé de *M. circinelloides* (4,042), suivi par celui de la pepsine de poulet (3,421) et en dernier l'extrait lyophilisé de ficine (2,40). Un facteur de purification faible peut être dû à plusieurs raisons, telles que des rendements de récupération sub-optimaux ou la persistance de contaminants, même après les étapes de purification.

Cependant, il convient de noter que le facteur de purification en utilisant le sulfate d'ammonium est relativement faible ($F \leq 10$), ce qui indique que la purification effectuée n'a pas conduit à une augmentation significative de l'activité spécifique par rapport à l'extrait brut initial (extrait de ficine et de *M. circinelloides*). Dans le cas d'un facteur de purification faible, il peut être envisagé d'optimiser les protocoles de purification afin d'améliorer la séparation des protéines et d'obtenir une plus grande pureté de la ficine. Cela pourrait impliquer l'exploration de différentes méthodes de purification, l'ajustement des conditions expérimentales ou l'utilisation de techniques supplémentaires pour éliminer les contaminants résiduels.

Le rendement obtenu pour la protéase de poulet après l'étape de lyophilisation (143,222%) est considérablement plus élevé que celui rapporté par Nouani (2009), qui était de 8,06%. Cette amélioration significative du rendement est le résultat de l'élimination des impuretés (fort possible des inhibiteurs de protéases) et l'augmentation de la concentration des enzymes actives dans l'extrait. Par contre, pour les autres extraits nous avons noté une diminution progressive de

ce paramètre, plus significativement au niveau des extraits lyophilisés, induite par une perte considérable de l'activité coagulante.

Le rendement obtenu dans le cas de l'extrait enzymatique fongique après l'étape de lyophilisation est de 18,78%, ce qui est considérablement inférieur au rendement rapporté par Nouani (2009) (55,13%), mais supérieur en même temps à celui noté par Talantikite (2015) (13,42%). La différence de rendement peut être due à des variations dans les méthodes expérimentales et les conditions de purification utilisées dans les différentes études.

Le rapport AC/AP a été amélioré également au fur et à mesure des étapes de purification, surtout dans le cas de la pepsine de poulet qui passe de 35,814 pour l'extrait brut à 173,712 au niveau de l'extrait lyophilisé, ce qui indique une augmentation avec un facteur de 4,85. Un facteur d'augmentation plus faible caractérise le rapport AC/AP de l'extrait lyophilisé de *M. circinelloides* (3,984). Cette amélioration du rapport AC/AP reflète l'élimination des protéases non spécifiques. Elle suggère également que la qualité du produit fini (fromage) sera améliorée avec l'augmentation de la capacité de coagulation des extraits lyophilisés. Par contre, aucune amélioration significative n'a été obtenue dans le cas des extraits de la ficine.

I.3. Production du fromage frais

I.3.1. Caractéristiques physico-chimiques du lait utilisé

Le lait utilisé pour la fabrication des fromages a été collecté dans la Wilaya de Boumrdes et ses entourages. Les caractéristiques physico-chimiques déterminées pour le lait utilisé dans la fabrication des différents fromages sont les suivantes:

- Densité: 1,032
- pH : 6,70
- Acidité titrable: 15°D
- Extrait sec total (EST): 10,78%.

Ces valeurs sont conformes aux normes AFNOR (1993) et similaires à celles rapportées par différents auteurs, tels que Ribadeau-Dumas (1991) et Silva et Malcata (2005). Selon ces références, les valeurs typiques pour le lait utilisé dans la fabrication de fromage sont les suivantes : un pH de 6,60 ; une acidité titrable de 15 à 17°D et un extrait sec total de 10 à 13%.

Ces caractéristiques physico-chimiques du lait sont importantes pour la fabrication du fromage, car elles influencent le processus de coagulation, la texture, l'arôme et d'autres aspects de la qualité du fromage final.

I.3.2. Caractérisation physico-chimique des fromages fabriqués

Les caractéristiques physico-chimiques des échantillons de fromage frais élaborés en utilisant les trois extraits lyophilisés (animal, végétal et fongique) sont résumées dans le **Tableau VII**, par comparaison à la présure commerciale (CHY-MAX Plus, Chr. Hansen).

Les observations que nous avons enregistrées indiquent que les fromages frais fabriqués avec les différents agents coagulants présentent des similarités au niveau de certains paramètres physicochimiques. Les fromages fabriqués avec les différents agents coagulants, tels que l'extrait lyophilisé de la pepsine et celui de *M. circinelloides*, présentent des valeurs de pH relativement similaires, qui sont plus élevées que celles obtenues avec la présure et l'extrait lyophilisé de la ficine. En outre, on remarque que les teneurs en matière grasse et en matière sèche sont également proches pour les quatre agents coagulants avec des faibles différences. Concernant le taux d'humidité, on constate que les trois échantillons du fromage élaborés avec les extraits coagulants testés sont plus humides que celui produit par la présure commerciale (63,81%), qui reflète probablement la capacité des caillés obtenus à retenir l'eau. L'ensemble des résultats obtenus indiquent que la variation dans l'agent coagulant exploité n'a pas un impact significatif sur les paramètres physicochimiques du fromage frais, ce qui suggère une certaine uniformité dans les caractéristiques générales des fromages fabriqués.

Tableau VII: Résultats des analyses physicochimiques des fromages frais élaborés par les extraits pré-purifiés de différentes origines.

Paramètre	Extrait lyophilisé de			Présure
	Pepsine de poulet	<i>M. circinelloides</i>	Ficine	
pH	5,12	5,08	4,54	4,78
Matière grasse (%)	12	13	14	14
Extrait sec total (%)	35,94	35,62	34,38	36,19
Humidité (%)	64,06	64,38	65,62	63,81

I.3.3. Analyse sensorielle des fromages fabriqués

L'objectif de cette analyse est de décrire les caractéristiques organoleptiques d'une nouvelle formulation de fromage frais élaborée par les différents extraits enzymatiques coagulant le lait en comparaison avec la formulation traditionnelle en utilisant la présure commerciale (**Tableau VIII**). Les paramètres sensoriels qui peuvent être évalués comprennent:

1. Aspect et texture : l'aspect visuel du fromage frais peut varier en fonction de la formulation. Il peut présenter une texture lisse, crémeuse ou même granuleuse. La consistance peut être ferme, fondante ou légèrement friable.
2. Odeur: chaque enzyme alternative peut apporter des nuances aromatiques spécifiques au fromage frais.
3. Saveur: la saveur du fromage frais peut varier en fonction de l'enzyme utilisée, tandis que les enzymes alternatives peuvent apporter des notes subtiles différentes, telles que des arômes plus doux ou acides.
4. Goût: le goût du fromage frais peut être évalué en termes de douceur, d'acidité et de salinité. Chaque enzyme peut influencer ces caractéristiques gustatives de manière différente, ce qui se traduit par des profils gustatifs uniques.



Extrait de la pepsine

Extrait de *M. circinelloides*

Extrait de ficine



Présure commerciale

Figure 17: Aspect des produits finis obtenus par les différents extraits lyophilisés par comparaison à la présure commerciale.

Tableau VIII: Résultats de l'analyse sensorielle des quatre échantillons de fromage frais .

Extrait lyophilisé \ Paramètre	Pepsine de poulet	<i>M. circinelloides</i>	Ficine	Présure
Aspect	Blanc crème	Blanc crème	Blanc crème	Blanc crème
Texture	Lisse	Lisse	Crémeuse	Lisse
Arôme	Naturel	Naturel	Naturel	Naturel
Odeur	Lait fermenté	Lait fermenté	Lait fermenté	Lait fermenté
Goût	Salé	Salé et acide	Salé et arrière-goût amer	Salé
Sensation mécanique	Souple	Souple	Gluante	Souple

Concernant la texture des fromages élaborés avec l'extrait lyophilisé de la ficine, il est intéressant de noter que les dégustateurs ont exprimé leur appréciation pour sa texture crémeuse, qui se rapproche de celle obtenue avec la présure. Cette caractéristique de texture crémeuse découle de la nature du caillé produit, qui se distingue par la présence de grains de taille réduite. Les dégustateurs ont évalué le goût des fromages obtenus à partir de l'extrait de ficine et ont remarqué une légère amertume, un goût modérément salé, avec une touche d'astringence relativement bien tolérée. Il est important de noter que cette caractéristique a été observée par plusieurs auteurs dans les fromages produits à l'aide de la ficine (Siar *et al.*, 2014).

En ce qui concerne la texture des fromages fabriqués avec l'extrait partiellement purifié de pepsine, les dégustateurs ont noté qu'elle est très similaire à celle obtenue avec la présure commerciale, avec un niveau de salinité modéré qui caractérise ces fromages.

Pour la texture des fromages obtenus avec l'extrait pré-purifié de *M. circinelloides*, nous avons remarqué que les dégustateurs ont apprécié sa texture lisse qui est proche de celle de la présure. Les dégustateurs ont jugé que le goût des fromages obtenus par cet extrait est acceptable. Il est moyennement salé et acide.

Du point de vue couleur et odeur, l'analyse a montré qu'il n'existe aucune différence entre les quatre fromages obtenus avec les différents agents coagulants utilisés.

En comparant les résultats d'application des trois extraits lyophilisés avec la présure dans la fabrication du fromage frais, des tendances émergent. Les résultats indiquent que la présure est généralement préférée, montrant la meilleure performance en termes de texture, de goût et d'appréciation globale. Les fromages élaborés avec la pepsine démontrent des caractéristiques similaires à ceux obtenus avec la présure, ce qui en fait une alternative crédible. Les échantillons établis avec l'extrait pré-purifié de *M. circinelloides* semblent s'approcher de la présure en termes de texture et de goût, bien que leur préférence soit légèrement inférieure. Enfin, les fromages à base de ficine se caractérisent par la préférence la moins élevée en raison des propriétés gustatives distinctes.

Donc après la dégustation par plus de 50 dégustateurs, on déduit que la pepsine de poulet semble être préférée en tant qu'alternative à la présure dans la fabrication de ce type de fromage. Les similitudes dans les caractéristiques de texture et de goût entre les fromages élaborés avec la pepsine de poulet et ceux obtenus avec la présure ont probablement contribué à cette préférence.

I.3.4. Rendement fromager

Le rendement fromager est un indicateur clé de l'efficacité dans la production fromagère. Il est utilisé pour évaluer la répartition quantitative des constituants du lait lors de l'égouttage, ce qui permet de juger si la fabrication du fromage a été réalisée dans des conditions optimales. Un rendement élevé indique que la transformation du lait en fromage a été efficace, avec une utilisation maximale des composants du lait pour produire la quantité du fromage désirée (Hosni *et al.*, 2022)

Les résultats des rendements obtenus pour le fromage frais fabriqué par les extraits lyophilisés de différentes origines sont présentés dans le **Tableau XI**.

Tableau IX: Rendements fromagers obtenus durant les essais de production du fromage frais par les trois extraits pré-purifiés.

Fromage produit par l'extrait de				
	Pepsine de poulet	<i>M. circinelloides</i>	Ficine	Présure
Poids (g)	1000	600	890	1100
Rendement (%)	22,7	13,60	20,20	25

L'analyse des données démontre que la présure a assuré le rendement le plus élevé, atteignant 25%. Cela suggère que la présure est l'enzyme la plus efficace pour la production de fromage, vu qu'elle s'agit d'une enzyme pure sans ingrédients ayant un effet négatif sur les quantités élaborées. La pepsine de poulet a également donné un rendement élevé proche de celui de la présure de l'ordre de 22,7%, ce qui indique qu'elle est également efficace pour la coagulation du lait et le processus de fabrication. En revanche, la ficine a présenté un rendement légèrement plus bas de 20,20%, tandis que l'extrait lyophilisé de *M.circinelloides* a donné le rendement le plus faible de 13,60%. Ce dernier résultat reflète la nature plus protéolytique de l'extrait fongique suivie légèrement par celui de la ficine. Par ailleurs, malgré le faible facteur de purification obtenu dans le cas de l'extrait lyophilisé de pepsine, les résultats sont promoteurs, qui vont être améliorés après la purification complète de l'enzyme et l'élimination des protéases non spécifiques et autres impuretés présentes au niveau des extraits bruts.

I.4. Fabrication du fromage Camembert

I.4.1. Caractérisation physico-chimique des fromages fabriqués

Les caractéristiques physico-chimiques des échantillons de fromage Camembert élaborés en utilisant l'extrait dialysé de la pepsine de poulet par comparaison à la présure commerciale (CHY-MAX Plus, Chr. Hansen) sont résumées dans le **Tableau X**.

Tableau X: Résultats des analyses physicochimiques des fromages Camembert élaborés.

Paramètre	Pepsine de poulet	Présure commerciale
pH	4,95	4,97
Matière grasse (%)	14	15
Extrait sec total (%)	41,22	40,78
Humidité (%)	58,78	64,16

D'après les résultats détaillés dans le tableau X, on constate que le pH des échantillons de fromage fabriqués est similaire et légèrement acide, ce qui reflète une acidification au cours de l'étape d'affinage grâce à l'activité des ferments ajoutés. Du même, les teneurs en matière grasse et en EST sont presque identiques. En ce qui concerne l'humidité, le fromage produit par la présure commerciale est caractérisé par une humidité plus élevée, atteignant 64,16%, par rapport à celle déterminé pour le Camembert produit par l'extrait dialysé de la pepsine. Ces différences, bien que relativement mineures, peuvent influencer certaines propriétés sensorielles (texture, le goût, l'arôme, sensation mécanique) des fromages fabriqués.

I.4.2. Analyse sensorielle

L'évaluation sensorielle des échantillons de fromage Camembert élaborés est résumée dans le **tableau XI**. La texture des fromages fabriqués en utilisant l'extrait de pepsine a été jugée comme étant molle par les dégustateurs et qu'elle perd sa fermeté plus rapidement. Ce résultat est en accord avec les conclusions des études antérieures menées par Stanley *et al.* (1980), Findlay *et al.* (1984) sur le fromage Cheddar, ainsi que par Zikiou (2013) durant ses travaux sur le même type de fromage fabriqué en utilisant la pepsine. Par contre, lorsque la présure est utilisée, le fromage présente une texture lisse et plus ferme. En fait, le développement de la texture de ce fromage au cours de l'affinage se déroule de manière plus lente. Cette stabilité dans la texture est attribuée à la faible activité protéolytique de la présure et à sa spécificité d'action sur les caséines.

Tableau XI: Résultats de l'analyse sensorielle des échantillons de fromage Camembert obtenus.

Extrait lyophilisé \ Paramètre	Pepsine de poulet	Présure
Aspect	Blanc cassé	Blanc cassé
Texture	Lisse	Lisse
Arôme	Beurre fondu	Beurre fondu
Odeur	Camembert	Camembert
Goût	Salé	Salé et acide
Sensation mécanique	Fondante	Fondante

Les dégustateurs ont évalué le goût des fromages fabriqués avec l'extrait de pepsine de poulet comme étant moyennement salé. Siar *et al.* (2014) ont signalé que les échantillons de fromage fabriqués avec l'extrait brut de pepsine ont été moyennement salés et acides, avec une amertume de plus en plus prononcée à partir du sixième jour d'affinage. Cette amertume peut être attribuée à l'activité protéolytique élevée de la pepsine, ainsi qu'à son action non spécifique sur les caséines. De plus, la quantité de pepsine ajoutée au début du processus de fabrication peut également contribuer à cette amertume. Il est intéressant de noter également que cette amertume a été observée par plusieurs auteurs dans le cas de fromages Cheddar fabriqués avec de la pepsine de poulet (Lemieux et Simard, 1991; Findlay *et al.*, 1984; Stanley *et al.*, 1980).

En revanche, lorsque nous avons utilisé la présure commerciale CHY-MAX Plus, le goût reste stable et est également perçu comme moyennement salé et légèrement acide tout au long de la période d'affinage. Du point de vue couleur et odeur, les analyses ont révélé qu'il n'y avait aucune différence notable entre l'application de la pepsine de poulet ou la présure commerciale comme agent coagulant.

Nos résultats laissent entendre qu'au moins en ce qui concerne ces aspects sensoriels essentiels, les fromages élaborés en utilisant ces deux agents coagulants devraient présenter des caractéristiques similaires. Cette constatation est encourageante, car elle indique que la pepsine de poulet pourrait être une alternative viable à la présure commerciale dans la fabrication du fromage, sans compromettre la qualité sensorielle du produit final. Cependant, d'autres tests analytiques peuvent être nécessaires pour évaluer d'autres aspects de la qualité du fromage, afin de confirmer ces résultats préliminaires.

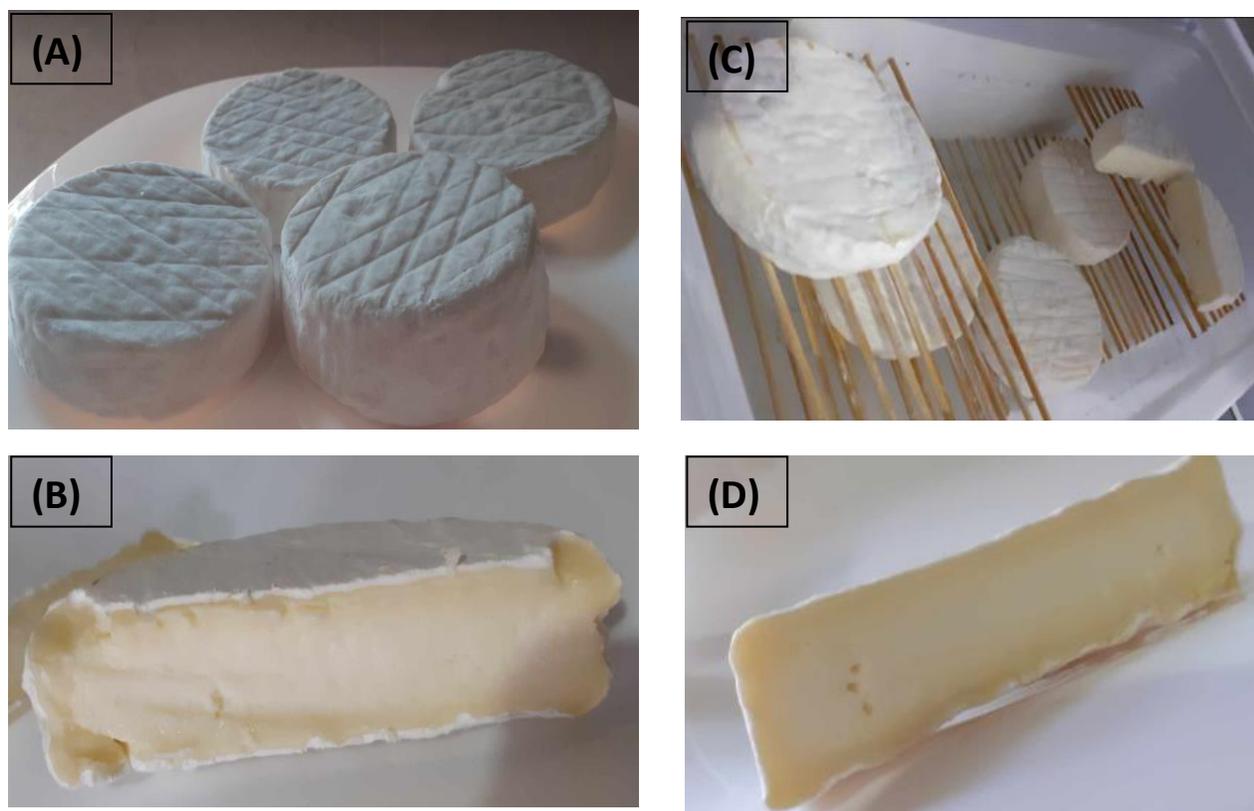


Figure 18: Aspect des fromages Camembert obtenus par l'extrait dialysé de la pepsine de poulet (A, B) par comparaison à la présure commerciale (C, D).

I.4.4. Rendement fromager

Les résultats des rendements obtenus pour le fromage Camembert fabriqué à l'aide de l'extrait dialysé de la pepsine de poulet et de la présure commerciale montrent une très faible différence de 0,2% (**Tableau XII**). Les deux agents coagulants ont donc des rendements très proches, avec une légère différence en faveur de la présure qui a un rendement légèrement supérieur.

Tableau XII: Rendements obtenus pour le fromage Camembert fabriqué par l'extrait dialysé de la pepsine de poulet et la présure commerciale.

	Fromage produit par l'extrait de	
	Pepsine de poulet	Présure
Poids (g)	894	910
Rendement (%)	14,90	15,10

Chapitre IV

Start-up
Start-up

I. Introduction

Aujourd'hui, les universités jouent un rôle essentiel en favorisant la création de la richesse à travers le développement de startups, comme le prévoit l'arrêté ministériel n°12-75 signé le 27 septembre 2022. Cet arrêté vise à soutenir les diplômés des établissements d'enseignement supérieur qui ont transformé leurs projets innovants en startups. Cette initiative s'inscrit dans le cadre de la stratégie du secteur visant à stimuler la création de richesse, à renforcer l'employabilité des diplômés, à favoriser leur intégration dans le milieu socioéconomique, et ainsi à contribuer au développement et à la promotion de l'économie nationale.

L'université revêt un rôle essentiel en stimulant l'innovation par les étudiants et les incitant à élaborer des produits et des solutions compétitives. Elle est également considérée comme une "institution citoyenne" engagée dans la recherche active de réponses aux défis sociaux, contribuant ainsi à la prise de décisions éclairées et à la mise en œuvre de mesures appropriées, tout en apportant une valeur ajoutée à l'économie nationale.

Notre projet vise à offrir une solution durable et économique en élaborant une enzyme protéolytique, la pepsine de poulet, à partir des proventricules, qui se considèrent comme un sous-produit de l'industrie avicole. Cette approche permet de réduire considérablement les coûts de production des fromages, tout en préservant les qualités et les caractéristiques recherchées.

Dans cette introduction, nous présentons les objectifs de notre projet, les étapes de production envisagées, ainsi que les avantages économiques, environnementaux et sanitaires associés à notre approche innovante. Nous examinons également les défis potentiels et les stratégies que nous envisageons pour garantir le succès de notre entreprise.

L'amélioration constante des procédés de fabrication fromagère est au cœur de notre projet. Notre objectif vise à développer une méthode de production alternative par la pepsine de poulet, déjà exploitée dans l'industrie fromagère au niveau de certains pays. Traditionnellement, la pepsine est extraite de sources animales, principalement les estomacs de veaux. Cependant, cette méthode soulève des préoccupations éthiques et environnementales et engendre des coûts élevés.

II. Présentation du projet

II.1. L'idée du projet

Le projet se concentre sur l'industrie alimentaire, en particulier l'extraction des enzymes protéolytiques à partir des proventricules de poulet. L'idée à l'origine de ce projet découle de la constatation d'une augmentation de la production et de la consommation du fromage dans le monde, tandis que la disponibilité de la présure, un coagulant traditionnellement utilisé dans la production du fromage, ne suit pas le même rythme de croissance. Cela a entraîné une pénurie mondiale de présure, exacerbée dans les pays musulmans en raison de considérations religieuses liées aux rituels d'abattage.

La pepsine de poulet est envisagée comme une alternative viable qui respecte ces préférences religieuses. Elle est plus facilement accessible et économique par rapport à la présure, qui peut être difficile à trouver et coûteuse dans certaines régions. De plus, la pepsine de poulet peut produire des résultats similaires en termes de consistance et de rendement dans la fabrication du fromage, tout en contribuant à obtenir la texture et la saveur souhaitées.

II.2. Qu'est-ce que vous allez faire :

- Cela se fait par la construction d'un laboratoire qui contient tous le matériel et les produits chimiques nécessaires et en s'appuyant sur la matière première (proventricules de poulet).
- Le lieu d'implantation est sélectionné où l'eau et l'électricité sont disponibles et il est préférable d'être proche des sources d'approvisionnement en échantillons et les fournisseurs des produits chimiques.

Les valeurs proposées

Le projet vise à produire une enzyme protéolytique à partir du proventricule de poulet. Cette matière première est largement disponible car elle provient d'une partie non comestible de la volaille (un déchet), ce qui rend notre produit moins coûteux que la présure tout en conservant des caractéristiques similaires.

Il est important de noter que, jusqu'à présent, il n'y a pas une production similaire de ce type d'enzymes dans notre pays. L'industrie fromagère algérienne utilise principalement de la présure importée. Notre projet vise à combler cette lacune en proposant une alternative locale et économique pour répondre aux besoins de l'industrie fromagère.

En résumé, nous cherchons à exploiter une ressource abondante et peu coûteuse (proventricule de poulet) pour produire une enzyme protéolytique qui peut être appliquée dans l'industrie fromagère locale, réduisant ainsi la dépendance à l'importation de la présure animale et/ou recombinante.

II. 3. Équipe de travail

Pour une petite entreprise de fabrication de l'enzyme cible (pepsine de poulet), l'équipe de travail peut être composée de quelques membres polyvalents qui assument plusieurs responsabilités. L'équipe du projet est composée des membres suivants :

- Deux étudiantes : ayant acquis une formation approfondie dans le domaine de la biochimie appliquée.
- Les rôles des deux étudiantes sont :
 - a) De diriger le projet et prendre les décisions stratégiques.
 - b) Elles sont responsables de l'exploitation quotidienne de l'atelier, y compris la fabrication de l'enzyme.
 - c) Contrôle de qualité du produit fabriqué, réalisation des tests afin d'assurer qu'il respecte les normes et les spécifications.
 - d) Responsable marketing et ventes : elles se chargent de la promotion du produit, de la recherche de clients potentiels, et de la gestion des relations avec les clients existants.
 - e) Responsable des achats : elles gèrent les approvisionnements en matières premières et en équipements nécessaires pour la production de l'enzyme.
 - f) Responsable administratif et financier : elles gèrent les aspects administratifs et financiers de l'entreprise, notamment la comptabilité, la gestion des dépenses et des revenus.

Au début de notre projet, nous pouvons assumer plusieurs rôles simultanément ajustés en fonction des ressources disponibles et des compétences spécifiques nécessaires. Avec l'avancement du projet, ces rôles peuvent varier en fonction de la taille de l'entreprise et de l'étendue des opérations, et l'équipe peut inclure d'autres membres en fonction des besoins du projet.

II.4. Objectifs du projet

Notre objectif est de devenir le principal producteur d'enzymes protéolytiques, principalement la pepsine de poulet, en Algérie au cours des cinq premières années. Nous visons

à atteindre progressivement une part du marché estimée à 20% au cours des premières années, puis à augmenter progressivement cette part jusqu'à atteindre 80% au cours des dernières années .tout en explorant également des opportunités sur le marché international.

II.5. Calendrier de la réalisation du projet

Notre calendrier de réalisation du projet est un élément essentiel pour planifier et suivre le déroulement de nos activités. Voici une ventilation des différentes étapes et du temps estimé pour chacune, en gardant à l'esprit que ces délais peuvent varier en fonction des circonstances spécifiques à notre projet :

1. Études préalables :choix de l'implantation de l'unité de production, préparation des documents nécessaires (1 an).
2. Location d'un siège de production (1 mois).
3. Commande des équipements (8 mois).
4. Installation des équipements (2 semaines).
5. Achat de matières premières (1 semaine).
6. Réalisation du prototype (5 jours).

Il est important de noter que ces délais sont approximatifs et peuvent être influencés par divers facteurs, notamment la disponibilité des ressources, les procédures administratives et les délais de livraison des équipements. Il est également nécessaire de prévoir du temps pour d'autres activités telles que les tests, la formation du personnel et la préparation de la production à grande échelle.

Un suivi régulier de l'avancement du projet par rapport à ce calendrier va nous aider à identifier les éventuels retards et à prendre des mesures correctives en conséquence. Une planification minutieuse est essentielle pour garantir le succès de notre entreprise.

III. Aspects innovants

III.1. Nature des innovations

Innovation du marché : Nous cherchons à innover en identifiant des niches de marché spécifiques et en développant des stratégies marketing novatrices pour promouvoir les avantages uniques de notre produit

Innovation technologique : Nous visons à innover en améliorant les méthodes de production, les procédés et les technologies utilisées pour extraire, purifier et appliquer la pepsine de poulet dans

le processus de fabrication du fromage. Cela pourrait impliquer l'optimisation de l'extraction, l'utilisation de la biotechnologie et du génie génétique.

Innovation économique : Notre objectif est d'innover en optimisant la rentabilité de notre projet en réduisant les coûts de production, en recherchant des économies d'échelle et en établissant des prix compétitifs tout en maintenant une marge bénéficiaire satisfaisante.

III.2. Domaines d'innovation

Les domaines d'innovation de notre projet sont diversifiés et promettent des avantages significatifs, c'est le premier projet en Algérie basé sur l'utilisation de la pepsine de poulet dans la fabrication des différents types de fromage.

1. **Utilisation de la pepsine de poulet dans la fabrication du fromage:** en utilisant la pepsine de poulet comme coagulant dans la production de fromages, ce qui n'a pas été fait auparavant.
2. **Durabilité et disponibilité des ressources:** en appliquant la pepsine de poulet, nous favorisons la durabilité et on réduit l'utilisation de la présure importée. Cette approche valorise également les sous-produits de l'industrie de volaille.
3. **Accessibilité économique:** en Algérie, où la disponibilité des matières premières peut être un défi, la pepsine de poulet pourrait être une option plus économique que la présure traditionnelle, tout en maintenant la qualité des fromages fabriqués.
4. **Réduction de la dépendance à l'importation:** notre projet contribuerait à réduire la dépendance de l'Algérie à l'importation des agents coagulants.
5. **Développement de la filière avicole:** notre projet pourrait stimuler le développement de l'industrie avicole en utilisant les sous-produits de cette industrie pour produire des enzymes, créant ainsi une chaîne de valeur plus complète.

Ces domaines d'innovation sont essentiels pour mettre en valeur les avantages et le potentiel de notre projet, tout en contribuant à résoudre des problèmes liés à la durabilité, à l'économie locale et à l'industrie alimentaire en Algérie.

IV. Analyse stratégique du marché

IV.1. Le segment du marché

- a) **Marché potentiel:** le marché potentiel pour notre enzyme pepsine de poulet comprend toutes les entreprises appliquées l'agent coagulant de lait en Algérie.

b) Le marché cible: le marché cible de notre enzyme se compose principalement de deux groupes:

- **Entreprises fromagères et producteurs artisanaux de fromages:** ces entreprises et producteurs peuvent utiliser l'enzyme d'intérêt comme alternative à la présure traditionnelle pour coaguler le lait et former le caillé dans le processus de fabrication du fromage. Cela peut offrir une solution moins coûteuse et potentiellement plus durable pour la production du fromage.

En ciblant ces marchés, notre projet pourrait répondre à la demande croissante de fromage en Algérie tout en offrant une alternative innovante et économique à la présure traditionnelle. Il est clair que le marché des entreprises fromagères en Algérie est assez étendu, couvrant un grand nombre de wilayas :

- **143 Entreprises fromagères:** Wilaya Ain Defla (1), Wilaya Aïn Temouchent (1), Wilaya Alger (47), Wilaya Annaba (2), Wilaya Batna (2), Wilaya Bechar (1), Wilaya Bejaia (7), Wilaya Biskra (2), Wilaya Blida (12), Wilaya Bouira (2), Wilaya Bouverdies (9), Wilaya Constantine (5), Wilaya El Tarf (2), Wilaya Ghardaia (6), Wilaya Jijel (2), Wilaya Khenchela (1), Wilaya M'Sila (1), Wilaya Mascara (2), Wilaya Medea (1), Wilaya Mila (1), Wilaya Mostaganem (1), Wilaya Oran (8), Wilaya Ouargla (2), Wilaya Oum El Bouaghi (1), Wilaya Relizane (2), Wilaya Saïda (1), Wilaya Sétif (2), Wilaya Sidi Bel Abbes (2), Wilaya Tamenrasset (2), Wilaya Tiaret (2), Wilaya Tipaza (1), Wilaya Tizi Ouzou (7), Wilaya Tlemcen (5).
- c) Notre choix de marché cible:** les entreprises de fromage qui sont déjà habituées à l'utilisation d'enzymes de coagulation dans leur processus de production. L'enzyme de pepsine de poulet offre une alternative naturelle et durable à la présure importée, ce qui pourrait susciter un grand intérêt parmi ces entreprises. De plus, les avantages en termes de qualité du fromage, tels que l'amélioration de la texture, de la saveur et de la digestibilité, sont des arguments de vente importants.
- d) L'analyse du marché et des clients potentiels:** est une étape cruciale pour réussir dans ce domaine. Il est important de recueillir des informations sur les clients potentiels, notamment leur historique d'achats, leur taille, leur position sur le marché et leurs besoins spécifiques. Comprendre leur politique d'approvisionnement et leur stratégie commerciale est essentielle pour adapter notre approche de vente. Cette analyse approfondie nous

aidera à évaluer la demande et à élaborer des stratégies pour conclure des contrats d'achat avec des clients importants.

IV. 2. Mesure de l'intensité de la concurrence

Il n'y a pas des entreprises qui fabriquent cette enzyme en Algérie, donc les concurrents les plus importants sur le marché algérien sont les importateurs de la présure à savoir l'entreprise Fly Chemicals.

Notre évaluation des concurrents est utile. Comme il n'y a pas actuellement de production locale d'enzyme pepsine de poulet en Algérie, les importateurs de présure sont en effet nos principaux concurrents. Le fait qu'ils aient une présence établie sur le marché, il a un avantage et une faiblesse, comme nous avons souligné. Leur dépendance vis-à-vis des fournisseurs étrangers et les coûts liés à l'importation pourraient les rendre vulnérables aux fluctuations du taux de change. Cette vulnérabilité pourrait être un argument de vente important pour notre produit, mettant en avant la stabilité de l'approvisionnement local.

IV. 3. La stratégie marketing

Pour l'emballage, nous avons opté pour la simplicité en utilisant des bouteilles en plastique d'1 litre pour la vente B2B (Business to Business). Pour les ventes B2C (Business to Consumer), nous proposons des petites bouteilles. Cette approche vise à répondre aux différents besoins du marché.

Notre marque, *EnzySafal*, est représentée par un logo qui met en évidence notre source, la pepsine de poulet, en utilisant l'image d'un poulet associé à des motifs de fromage pour illustrer son utilisation dans la fabrication fromagère (**Figure 19**).

De plus, nous mettons en avant les avantages de la pepsine de poulet par rapport à la présure importée, notamment son caractère durable, son coût potentiellement inférieur et ses avantages en termes de qualité du fromage.

Pour renforcer nos relations avec l'industrie, nous proposons des échantillons gratuits pour essayer notre produit, et pour les consommateurs, nous utilisons une stratégie de visibilité sur les sites web et les médias sociaux.

Nous avons mis en place une stratégie de commercialisation qui repose sur des prix compétitifs obtenus grâce à une réduction des coûts, ce qui constitue une base solide pour

pénétrer le marché. Notre politique de tarification est alignée sur nos coûts de production, garantissant ainsi une offre compétitive sur le marché.

De plus, nous avons développé des relations publiques pour renforcer notre visibilité et notre crédibilité sur le marché. Tout cela s'inscrit dans notre objectif de devenir le principal producteur d'enzymes protéolytiques en Algérie et de conquérir des opportunités sur le marché international.



Figure 19 : Le logo de notre marque

V. Plan de production et d'organisation

V. 1. Processus de production

1. Sélection et préparation des matières premières

- a. Identifier les fournisseurs de poulet de qualité.
- b. Établir les critères de sélection et les procédures d'approvisionnement.
- c. Préparer les échantillons de poulet pour les étapes suivantes.

2. Extraction de l'enzyme pepsine

- a. Développer un protocole d'extraction adapté à la production d'enzyme.
- b. Optimiser les paramètres d'extraction, tels que le pH, la température et le temps.
- c. Effectuer des essais pour évaluer le rendement et la qualité de l'extraction.

3. Purification de l'enzyme

- a. Établir un processus de purification pour éliminer les impuretés et obtenir une enzyme pepsine pure.
- b. Utiliser des techniques de chromatographie ou d'ultrafiltration pour la purification.

- c. Effectuer des contrôles de qualité pour vérifier la pureté et l'activité de l'enzyme.

4. Caractérisation et tests

- a. Caractériser l'enzyme pepsine produite en termes d'activité enzymatique, de stabilité et de spécificité.
- b. Effectuer des tests de performance comparatifs avec d'autres enzymes protéolytiques disponibles sur le marché.
- c. Évaluer les paramètres optimaux de stockage et de conservation de l'enzyme.

5. Le conditionnement du produit

- a. Choisir les formats et les matériaux d'emballage appropriés.
- b. Créer des étiquettes informatives et attrayantes.
- c. Protéger le produit pendant le transport et le stockage.
- d. Veiller à ce que les instructions d'utilisation soient claires. De plus, il est recommandé de privilégier des matériaux d'emballage respectueux de l'environnement.

6. Échelle de production

- a. Développer un plan d'échelle de production pour augmenter la quantité d'enzyme produite.
- b. Optimiser les conditions de production pour assurer une production cohérente et efficace.
- c. Mettre en place des contrôles de qualité et des procédures pour garantir la conformité aux normes de l'industrie.

7. Validation et documentation

- a. Effectuer des tests de validation pour évaluer la conformité de l'enzyme produite aux spécifications requises.
- b. Documenter tous les processus, les résultats et les procédures de production.
- c. Préparer les rapports nécessaires pour la protection intellectuelle et la commercialisation.

V. 2. L'approvisionnement

Dans le processus d'achat, nous traitons directement avec les fournisseurs de la matière première (le proventricule de poulet), les fournisseurs des produits chimiques et les matériaux nécessaires de laboratoire.

Le paiement de la matière première est direct, car elle est considérée comme un déchet, donc elle est moins cher. Concernent les produits chimiques et le matériels de laboratoire, le paiement se fait avec un crédit.

V. 3. La main d'œuvre

Avec avancement, notre projet crée environ 60 postes.

- **Recrutement et formation:** assurons-nous d'avoir un processus de recrutement solide pour sélectionner les candidats les plus qualifiés pour chaque poste. Prévoyons également des programmes de formation pour assurer que notre personnel maîtrise les compétences nécessaires.
- **Gestion des ressources:** nous devons avoir une équipe de gestion compétente pour superviser les différentes fonctions de l'entreprise, de la production au marketing en passant par la finance. Une bonne gestion est essentielle pour garantir l'efficacité opérationnelle.
- **Normes de qualité:** pour les postes liés à la qualité, assurons-nous que notre personnel comprend et suit les normes de qualité strictes pour garantir la cohérence du produit.
- **Gestion des ressources humaines:** prévoyons un département ou une personne chargée de la gestion des ressources humaines pour gérer les questions liées aux employés, y compris les avantages sociaux, les questions de conformité et la résolution de conflits.
- **Santé et sécurité au travail:** assurons-nous que notre entreprise respecte toutes les normes de santé et de sécurité au travail pour protéger la santé de nos employés.
- **Culture d'entreprise:** développons une culture d'entreprise positive qui favorise l'engagement des employés et encourage l'innovation. Une culture solide peut aider à maintenir la cohésion de l'équipe.
- **Évolutivité:** envisageons la croissance future de notre entreprise et comment cela affectera nos besoins en personnel. Prévoyons une stratégie de recrutement pour l'extension.
- **Communication:** établissons des canaux de communication efficaces au sein de notre entreprise pour garantir que les informations et les directives sont transmises de manière claire à tous les niveaux.
- **Motivation et reconnaissance:** mettons en place des programmes de motivation et de reconnaissance pour récompenser les performances exceptionnelles et maintenir la motivation de nos employés.

Gérer une équipe peut être un défi, mais avec une planification appropriée et une attention aux détails, nous pouvons construire une équipe solide qui contribue au succès de notre projet.

VI. Plan financier

VI.1. Coûts et charges

- **Tableau XIII:** Coûts du matériel de laboratoire sur une période de 10 ans: inclusion des factures dans l'annexe.

Désignation	Quantité	Prix unitaire (DA)	
Paillasse de laboratoire	1	25000	25000
Centrifugeuse réfrigérée	1	477 164	477164
Distillateur 10 L Type: HS.Z11.10L	1	80000	80000
Spectrophotomètre UV-visible	1	354 000	354000
Agitateur magnétique	1	147 500	147500
pH mètre	1	51 603	51603
Bain marie	1	78 000	78000
Bain à ultrasons 6,5 L Type: FSF-031S	1	54600	54600
Mixeur	1	10000	10000
Balance analytique	1	15 500	15500
Vortex	1	38 700	38700
Réfrigérateur	1	64000	64000
Micropipette 100-1000 µL	2	6 760	13520
Total			1409587

- **Tableau XIV:** Coûts de verrerie et petits équipements de laboratoire pour 5 ans :

Désignation	Quantité	Prix unitaire (DA)
Bécher en verre 50 mL	1	381
Bécher en verre 100 mL	1	461
Bécher en verre 250 mL	1	450
Bécher en verre 500 mL	1	998
Bécher en verre 1000 mL	1	1 299
Fiole jaugée 100 mL	1	2 999
Fiole jaugée 250 mL	1	3999
Fiole jaugée 500 mL	1	4 374
Fiole jaugée 1000 mL	1	7 497

Erlenmeyer 100 mL	(10 PCE)	4 003
Erlenmeyer 250 mL	(06PCS)	5 278
Erlenmeyer 500 mL	(12 PCS)	12 996
Flacons en verre 500 mL	1	2420
Eprouvette graduée en verre 100 mL	1	1 083
Eprouvette graduée en verre 500 mL	1	1 700
Portoir de tubes à essai	1	1 965
Tube conique 15 mL	(10 pièces)	500
Boudine de dialyse	152 m	18 748
Tube Eppendorfs 1,5 mL	500 unités	1 640
Cuves en verre	(10 unités)	5999
Tubes à essai	(100 PCE)	4 454
Égouttoir	1	6 500
Total		89742

- **Tableau XV:** Les coûts des fournitures de bureau

Matériel de bureau	Prix (DA)
Bureau et chaise	20000
PC	50000
Imprimante	20000
Climatiseur	70000
Total	160000

- **Tableau XVI:** Les frais du transport

Transport	Prix (DA)
Transport	2000000

- **Tableau XVII:** Les couts des produits chimiques

Désignation	Quantité	Prix unitaire (DA)	Durée de vie
NaOH	1 kg	4000	2 ans
HCL	1 L	2000	2 ans
Acide citrate	1 Kg	8000	2 ans
Phosphate de sodium dibasique	500 g	11000	2 ans
Chlorure de sodium	1 kg	3500	2 ans

EDTA	1 Kg	8000	2 ans
Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃)	1 Kg	4000	2 ans
Sulfate d'ammonium (NH ₄) ₂ SO ₄	1 Kg	5000	2 ans
Acide trichloracétique (TCA)	1 Kg	15000	2 ans
Réactif de Folin-Ciocalteu	500 MI	23000	2 ans
Citrate de sodium	1 L	8300	2 ans
caséine (Sigma-Aldrich)	500 g	1161,93	2 ans
BSA (Sigma-Aldrich)	25 g	36000	2 ans
Bleu Brillant de Commassie G250	25 g	14000	2 ans
Ethanol absolu	1 L	2400	2 ans
Total		108661,93	

- **Tableau XVIII:** Autres frais

Des autres frais	Prix	Durée
Affaires de bureaux	12000	1 ans
Equipement de nettoyage	10000	1 ans
Vêtements	12000	1 ans
Emballage	24000	1 ans
Total	58 000	

VI.2. Chiffre d'affaires

Tableau XIX: Le scénario optimiste

Produit destiné au client	N+1	N+2	N+3	N+4	N+5
Quantité du produit (L)	1200	2592	4320	6048	7776
Prix HT du produit (DA)	6000	6000	6500	7000	7500
Ventes du produit (L)	780	1685	3024	4536	6221
Chiffre d'affaires global (DA)	4680000	10110000	19656000	31752000	46657500

Tableau XX: Le scénario pessimiste

Produit destiné au client	N+1	N+2	N+3	N+4	N+5
Quantité du produit (L)	1200	2592	4320	6048	7776
Prix HT du produit (DA)	5500	6000	6500	7000	7500
Ventes du produit (L)	440	1166	2160	3326	4666
Chiffre d'affaires global (DA)	2420000	6996000	14040000	23282000	34995000

VI. 3. Comptes de résultats

Explication de la méthode de calcul de résultats

Consommation de l'exercice = l'achat consommé + service extérieur et autre consommation

La valeur ajoutée d'exploitation = la production de l'exercice - consommation de l'exercice

Résultat opérationnel = Excédent Brut d'Exploitation - Dotations aux amortissements

- **Le besoin en fonds de roulement BFR :**

La notion de besoins en fonds de roulement : sont les montants que l'entreprise doit déployer afin de compenser les exigences découlant des variations de trésorerie entre les encaissements et les décaissements.

BFR = Actives circulant - passive circulant.

BFR = les clients + les stocks - les fournisseurs.

Tableau XXI: le BFR de l'entreprise

Année	N+1	N+2	N+3	N+4	N+5
BFR	1137773	2254761	5586541	4298073	2200800

Le fond de roulement :

Le fonds de roulement représente une réserve financière constamment disponible permettant de prendre en charge les dépenses courantes d'une entreprise, telles que le paiement des fournisseurs, des employés et des frais de fonctionnement, en attendant de recevoir les paiements de ses clients.

FR = capitaux propres - actif non courant

Tableau XXII: le FR de l'entreprise

Année	N+1	N+2	N+3	N+4	N+5
FR	5697773	6890412	17758091	19540073	36213506

Un fonds de roulement positif indique que les ressources de l'entreprise sont suffisantes et stables sur une période de plus d'un an, ce qui permet de soutenir ses opérations. Lorsqu'il est

calculé sur le court terme, un fonds de roulement positif signifie que la liquidation des actifs à court terme peut servir à rembourser les dettes à court terme si nécessaire.

VI. 4. Plan de trésorerie

La trésorerie nette se calcule comme suit : approche par le haut du bilan :

Trésorerie nette = fonds de roulement – besoin en fonds de roulement

Tableau XXIII: la trésorerie de l'entreprise

Année	N+1	N+2	N+3	N+4	N+5
FR	5697773	6890412	17758091	19540073	36213506
BFR	1137773	2254761	5586541	4298073	2200800
TN	4560000	4635651	12171550	15242000	34012706

TN > 0 : l'équilibre financier est atteint, signe de solvabilité

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Dans notre travail, nous avons réalisé des essais expérimentaux pour étudier la coagulation du lait par différents extraits enzymatiques obtenus à partir de sources d'origine animale (pepsine de poulet), végétale (latex de figuier) et microbienne (souche *M. circinelloides*), dans le but de remplacer la présure commerciale importée par des alternatives potentiellement plus durables et locales. Notre étude consistait à caractériser ces trois agents coagulants et à tester leur efficacité dans la fabrication de deux types de fromage (Frais et Camembert). Cette étude a assuré également d'approfondir nos connaissances théoriques et pratiques dans le domaine de la technologie de transformation fromagère.

Dans notre démarche, nous avons suivi trois étapes. Premièrement, nous avons procédé à récupérer les matières premières contenant les systèmes enzymatiques recherchés et les extraire à partir des proventricules de poulet, du latex de figuier et de la culture de *M. circinelloides*. Ensuite, nous avons caractérisé les propriétés coagulantes et protéolytiques de ces extraits enzymatiques, ce qui a assuré l'évaluation de l'efficacité de chaque extrait dans le processus de coagulation du lait et la dégradation de ses protéines. L'extrait de ficine a exercé la force coagulante la plus élevée, par contre l'extrait de pepsine a présenté l'effet le plus faible sur l'hydrolyse des caséines du lait. Ces informations sont cruciales pour estimer leur potentiel d'utilisation dans la fabrication des fromages ciblés.

Deuxièmement, nous avons entrepris une étape de pré-purification en utilisant une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium suivie par une étape de dialyse. Cette démarche a permis de concentrer les enzymes, d'éliminer une partie des impuretés et d'améliorer la pureté et la qualité des extraits enzymatiques. La réussite de cette étape a été constatée plus avec l'extrait de pepsine de poulet suivi par l'extrait fongique de *M. circinelloides*, concernant le rendement, le facteur de purification et le rapport AC/AP.

Troisièmement, nous avons procédé à la fabrication du fromage à pâte molle type "Camembert" et du fromage frais à l'échelle industrielle, en remplaçant la présure par les trois extraits lyophilisés de la pepsine, de ficine et de *M. circinelloides*, en suivant le même processus de fabrication. Au cours de cette étape, nous avons analysé le rendement fromager ainsi que les caractéristiques physico-chimiques et sensorielles des fromages obtenus. Nous avons noté que

les fromages fabriqués à partir de l'extrait lyophilisé de la pepsine de poulet étaient pratiquement similaires à ceux produits par la présure commerciale, avec seulement une légère différence dans le rendement fromager, la texture et le goût.

En conclusion, notre étude démontre des résultats prometteurs en mettant en évidence la possibilité d'obtenir des extraits enzymatiques capables de remplacer la présure commerciale dans l'industrie fromagère. L'enzyme de pepsine issue de poulet s'est avérée particulièrement remarquable assurant l'obtention des fromages ayant un profil de saveur proche de celui obtenu avec la présure commerciale. De plus, bien que le rendement fromager assuré par l'extrait lyophilisé de *M. circinelloides* soit plus faible, il a démontré un excellent goût et une texture appréciable pour les fromages frais produits. De même, l'extrait de ficine a également présenté des résultats prometteurs avec une texture intéressante caractérisant les fromages frais fabriqués.

Ces résultats sont d'autant plus passionnants que ces extraits enzymatiques sont obtenus à partir de matières premières locales disponibles et inexploitées, ce qui pourrait contribuer à réduire la dépendance aux coagulants importés et favoriser une production fromagère plus durable et adaptée aux pratiques locales. De plus, l'enzyme de pepsine issue du poulet se présente comme une option optimale dans l'industrie fromagère, ouvrant la voie à une filière fromagère plus durable, locale et respectueuse de l'environnement.

En perspectives, il serait intéressant de poursuivre ce travail par des recherches complémentaires, en effectuant :

- Une purification totale des trois extraits enzymatiques afin d'obtenir des enzymes encore plus pures et efficaces ;
- Une étude de faisabilité technico-économique de l'extraction de ces enzymes coagulantes pourrait également être réalisée pour évaluer leur viabilité commerciale en fromagerie ;
- L'utilisation des enzymes extraites soit d'origine animale, végétale ou microbienne à grande échelle en technologie fromagère et mener une étude comparative sur la qualité des produits finis;
- L'étude des paramètres influençant l'activité des enzymes purifiées afin d'améliorer la qualité et le rendement fromager.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- AFNOR, (1993). Contrôle de la qualité des produits alimentaires: lait et produits laitiers: analyses physicochimiques. Paris La Défense: AFNOR, 4e édition. 581 p.
- AGRAWAL, Deepti, PATIDAR, Pankaj, BANERJEE, Tushar, *et al.* Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 2005, vol. 40, no 3-4, p. 1131-1136.
- ALAIS, C. Produits laitiers divers. *Science du lait: Principes des techniques laitières*, 4th ed. Editions: SEPAIC, Paris, France, 1984, p. 723-763.
- ALAMGEER, IMAN, Shifa, ASIF, Hira, *et al.* Evaluation of antihypertensive potential of *Ficus carica* fruit. *Pharmaceutical Biology*, 2017, vol. 55, no 1, p. 1047-1053.
- ALIPOUR, Hamzeh, RAZ, Abbasali, ZAKERI, Sedigheh, *et al.* Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2016, vol. 6, no 11, p. 975-981.
- ALJAMMAS, Houthail Alahmad, AL FATHI, Hassan, et ALKHALAF, Walid. Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rhizomucor miehei* using solid-state fermentations. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, vol. 16, no 1, p. 213-216.
- ALMENA-ALISTE, Montserrat et MIETTON, Bernard. Cheese classification, characterization, and categorization: a global perspective. *Cheese and Microbes*, 2014, p. 39-71.
- ANSON, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of general physiology*, 1938, vol. 22, no1, p. 79.
- ARAÚJO, B. F., RAMOS, E. L. P., CONTIERO, J., *et al.* The role of the type of substrate, particle size, and coagulations analytical method on microbial rennet synthesis by *Mucor miehei* Cooney & R. Emers., 1964 (Fungi: *Zygomycota*) via solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 2015, vol. 2, no 4, p. 245-251.
- ARIMA, Kei, YU, Juhyun, et IWASAKI, Shintiro. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 1970. p. 446-459.
- A Zikiou ,FA Benyahia-Krid, O Aissaoui-Zitoun, H Boughellout, F Adoui, A Harkati, EH Siar, A Hamadi, MNE Zidoune , 2016.
- BACHIR, Nasr Eddine et RAHMOUNI, Rafiq. *Les principales pathologies digestives chez les poulets de chair*. 2011. Thèse de doctorat. université Ibn Khaldoun-Tiaret.

- BADGUJAR, Shamkant B., PATEL, Vainav V., BANDIVDEKAR, Atmaram H., *et al.* Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica*: A review. *Pharmaceutical biology*, 2014, vol. 52, no 11, p. 1487-1503.
- BENSMAIL, Souhila et NAIMI-FAZOUANE, Fethia. Purification and biochemical characterization of aspartic peptidase produced by novel isolate *Mucor circinelloides* (von tieghem) using SSF process. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2019, 590-598.
- BENSMAIL, Souhila, BENTALEB Taous & OUSDIDENE Baya. Production des peptides bioactifs par l'application des extraits protéolytiques d'origine végétale. Mémoire de Master : Biochimie Appliquée, Faculté SNV-ST, Université de Bouira, 2022a.
- BENSMAIL, Souhila, BELKEBIR Ismahan & ABDI Ouiem. Production et extraction d'une protéase acide d'origine fongique coagulant le lait: optimisation par les plans d'expériences. Mémoire de Master : Biochimie Appliquée, Faculté SNV-ST, Université de Bouira, 2022b.
- BENSMAIL, Souhila, OUARAB Nassima & HAMRI Yasmina. *Comparaison des méthodes d'extraction de la pepsine de poulet : Application de l'extrait pré-purifié dans la fabrication du fromage à pâte molle type Camembert*. Mémoire de Master : Analyses biochimiques et Biologiques, Faculté SNV-ST, Université de Bouira, 2017.
- BENYAHIA-KRID, F. A., ADOUI, F., AISSAOUI-ZITOUN, O., *et al.* Effect of sodium chloride and incision on the chicken pepsin coagulant activity extracted from proventriculus, dried under partial vacuum. *J. Adv. Dairy Res.*, 2017, vol. 5, no 3, p. 4.
- BINTSIS, Thomas et PAPADEMAS, Photis. An overview of the cheesemaking process. *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*, 2017, p. 120-156.
- BOHAK Z. Purification and characterisation of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, vol. 244, no 17, p.4638-4648.
- BOLLAG, D., ROZYCKI, M., & EDELSTEIN, S. *Protein methods*. 2nd Ed. New York, USA: Wiley Liss, Inc. 1996, 414 p.
- BOTHA, A., & BOTES, A. 2014. *Mucor*. In Batt, C. A. & Tortorello, M. L. (eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology*, Vol. 2. (pp. 834-840). Academic Press, Elsevier Ltd.
- BOUDCHICHA, R. H., HORMAZA, J. I., et BENBOUZA, H. Diversity analysis and genetic relationships among local Algerian fig cultivars (*Ficus carica* l.) using SSR markers. *South African Journal of Botany*, 2018, vol. 116, p. 207-215.
- BOUGHELLOUT, H. et ZIDOUNE, M. N. *Coagulation de lait par la pepsine de poulet*. (2008). Thèse de doctorat. Université Frères Mentouri-Constantine 1.

- BOUMEDIENE, Farida. *Etudes des propriétés biochimiques, sensorielles et rhéologiques des fromages fabriqués à base de présure de remplacement d'origine végétale (Cynara scolymus) et microbienne (Bacillus velezensis FK6A, Mucor circinelloides SF15)*. (2021). Thèse de doctorat.
- BOURAS, Biya et AÏSSAOUI-ZITOUN, Ouarda. Optimization of flocculation and clotting time of camel milk with camel and goat rennets, and chicken pepsin in comparison with cow milk using response surface method (RSM). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2022.
- BOUTARFA, Asma. *Authentification et variabilité des fromages à pates molles type Camembert: influence du stade physiologique de la vache laitière*. Thèse de doctorat. Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis.
- BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteine-dye binding. *Annals of Biochemistry*, 1976, vol. 72, 248-254.
- BURGESS, Richard R. Protein precipitation techniques. *Methods in enzymology*, 2009, vol. 463, p. 331-342.
- CORREDIG, M. et SALVATORE, E. Enzymatic coagulation of milk. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*, 2016, p. 287-307.
- COULON Pierre, DESACHY Adèle. *Je fais mes fromages : 16 recettes de fromages frais à faire chez soi* (2019).
- CRISOSTO, H., FERGUSON, L., BREMER, V., et al. Fig (*Ficus carica* L.). In: *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits*. Woodhead Publishing, 2011. p. 134-160e.
- CRUZ, Adriano G., FARIA, José AF, POLLONIO, Marise AR, et al. Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. *Trends in Food Science & Technology*, 2011, vol. 22, no 6, p. 276-291.
- DA SILVA, Ronivaldo Rodrigues. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, vol. 183, p. 1-19.
- DANLEY, Dennis E. et GEOGHEGAN, K. F. Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin C. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, vol. 263, no 20, p. 9785-9789.
- DEVARAJ, K. B., GOWDA, Lalitha R., et PRAKASH, V. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry*, 2008, vol. 69, no 3, p. 647-655.
- DOUAG NÉE TIRICHINE, Nassima. *Extraction et caractérisation de quelques plantes locales à pouvoir coagulant le lait*. (2011). Thèse de doctorat.

- DROUIN, Mathieu. *Étude de production de protéases alcalines par Bacillus licheniformis en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat*. 2005. Thèse de doctorat. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique.
- ESPOSITO, Marilena, DI PIERRO, Prospero, DEJONGHE, Winnie, *et al.* Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. *Food chemistry*, 2016, vol. 204, p. 115-121.
- FAZILI, Abu Bakr Ahmad, SHAH, Aabid Manzoor, ZAN, Xinyi, *et al.* *Mucor circinelloides*: a model organism for oleaginous fungi and its potential applications in bioactive lipid production. *Microbial Cell Factories*, 2022, vol. 21, no 1, p. 1-19.
- FEIJOO-SIOTA, Lucía et VILLA, Tomás G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, vol. 4, p. 1066-1088.
- FINDLAY, C. J., STANLEY, D. W., et EMMONS, D. B. Chicken pepsin as a rennet substitute. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 1984, vol. 17, no 2, p. 97-101.
- FOX, Patrick F. et MCSWEENEY, Paul LH. Cheese: an overview. *Cheese*, 2017, p. 5-21.
- FOX, Patrick F., GUINEE, Timothy P., COGAN, Timothy M., *et al.* Enzymatic coagulation of milk. *Fundamentals of cheese science*, 2017, p. 185-229.
- FREITAS, A. C., RODRIGUES, D., DUARTE, A. C., *et al.* The principals of cheese making: an overview. *Handbook of cheese in health: Production, nutrition and medical sciences*, 2013, p. 485-507.
- GARG, S. K. et JOHRI, B. N. Immobilization of milk-clotting proteases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1993, vol. 9, p. 139-144.
- GENGLER, Nicolas, BAETEN, Vincent, SINDIC, Marianne, *et al.* Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. (2017).
- GILLIS, Jean-Claude, AYERBE, André, LINCET, D., *et al.* *Le fromage*. Technique et Documentation, 2018.
- GÎNCUL, Veronica et ISAC, M. Les Français et les fromages. 2010.
- GIORDANO, Cristiana, MALECI, Laura, AGATI, Giovanni, *et al.* *Ficus carica* L. leaf anatomy: Trichomes and solid inclusions. *Annals of Applied Biology*, 2020, vol. 176, no 1, p. 47-54.
- GRANDAY, P. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE D'EXTRAITS COAGULANTS D'ORIGINE ANIMALE. 1978.

- GUASMI, Ferdaous, FERCHICHI, Ali, FARES, Kadija, *et al.* Identification and differentiation of *Ficus carica* L. cultivars using inter simple sequence repeat markers. *African Journal of Biotechnology*, 2006, vol. 5, no 15.
- GUETOUACHE, Mourad, GUESSAS, Bettache, et MEDJEKAL, Samir. Composition and nutritional value of raw milk. *J. Issues Biol. Sci. Pharm. Res.*, 2014, vol. 2350, p. 1588.
- GURUMALLESH, Poorani, ALAGU, Kamalini, RAMAKRISHNAN, Baskar, *et al.* A systematic reconsideration on proteases. *International journal of Biological Macromolecules*, 2019, vol. 128, p. 254-267.
- GURUMALLESH, Poorani, ALAGU, Kamalini, RAMAKRISHNAN, Baskar, *et al.* A systematic reconsideration on proteases. *International journal of Biological Macromolecules*, 2019, vol. 128, p. 254-267.
- HAMRANI, Lamia. *Étude comparative de deux protéases coagulant le lait, extraites de pro ventricules de poulet (Gallus gallus) et d'estomacs de limon (Seriola sp.)*. (2008). Thèse de doctorat. INA.
- HORNE, David S. et LUCEY, John A. Rennet-induced coagulation of milk. *Cheese*, 2017, p. 115-143.
- HOSNI, Feriel, KHOKHI, Noura, BENOMIER, Nossaiiba. *Identification d'une souche productrice de protéase isolée du sol d'une laiterie en vue de son utilisation pour la fabrication d'un fromage*. 2022. Thèse de doctorat.
- ILBOUDO, A. J., SAVADOGO, A., SEYDI, M. G., *et al.* Place de la matière azotée dans le mécanisme de la coagulation présure du lait. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2012, vol. 6, no 6, p. 6075-6087.
- JEANTET Romain, CROGUENNEC Thomas, MAHAUT Michel, Pierre SCHUCK, BRULÉ Gérard. *Les produits laitiers*. 2e éd. Paris: Lavoisier, Tec & Doc, 2008.
- JOSEPH, Baby et RAJ, S. Justin. Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn—An overview. *International journal of pharmtech research*, 2011, vol. 3, no 1, p. 8-12.
- KAHLOUCHE, Amal. *Caractérisation biochimique comparée des protéases coagulant le lait d'origine animale (chevreau), végétale (Tourteau de tournesol) et microbienne (Bacillus mojavensis P47M). Effets catalytiques sur les caséines des laits bovin et caprin*. 2018. Thèse de doctorat. ENSA.
- KHANAL, Bal Kumari Sharma, PRADHAN, Monica, et BANSAL, Nidhi. Cheese: Importance and introduction to basic technologies. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, 2019, vol. 11, p. 14-24.

- KINDSTEDT, Paul S. The basics of cheesemaking. *Cheese and microbes*, 2014, p. 17-38.
- KRAUSE W., PATZSH M., HASSAN Z.M.R. and HAUFE T., 1998. Substrate and binding specificity of aspartic protease with milk-clotting properties. *Nahrung* 42, Nr. 3/4: 162-165.
- KRID, Née BENYAHIA F. A. et ZIDOUNE, M. N. Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vue d'une valorisation des proventricules de volailles au profit de la filière lait en Algérie. (2013).
- LEBRETON, Annie, CORRE, Erwan, JANY, Jean-Luc, *et al.* Comparative genomics applied to *Mucor* species with different lifestyles. *BMC genomics*, 2020, vol. 21, no 1, p. 1-21.
- LEMIEUX, L. et SIMARD, R. E. Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Le Lait*, 1991, vol. 71, no 6, p. 599-636.
- LENOIR, J., LAMBERET, Gilles, et SCHMIDT, J. L. L'élaboration d'un fromage: l'exemple du Camembert. 1983.
- LÉONIL, Joelle, MICHALSKI, Marie-Caroline, et MARTIN, Patrice. Les structures supramoléculaires du lait: structure et impact nutritionnel de la micelle de caséine et du globule gras. *INRAE Productions Animales*, 2013, vol. 26, no 2, p. 129-144.
- LI, Quanyang et ZHAO, Zhengtao. Acid and rennet-induced coagulation behavior of casein micelles with modified structure. *Food chemistry*, 2019, vol. 291, p. 231-238.
- LOMOLINO, Giovanna, ZANNONI, Stefania, et DI PIERRO, Giovanna. Characterization of Crude Esterase Activity from Two Plants Used in Cheese Making: *Cynara cardunculus* L. and *Ficus carica* L. *Food Biotechnology*, 2015, vol. 29, no 4, p. 297-316.
- LOPEZ, Christelle, LE RUYET, P., et QUIBLIER, Jean Paul. Matière grasse laitière dans les fromages affinés : Effets de sa composition, de sa structure et des autres constituants de la matrice sur sa digestion et conséquences métaboliques. *Sciences des Aliments*, 2010, vol. 29, no 1, p. 69.
- LOWRY, Oliver H., ROSEBROUGH, Nira J., FARR, A. Lewis, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 1951, vol. 193, p. 265-275.
- MAHMOUDI, S., KHALI, M., BENKHALED, A., *et al.* Fresh figs (*Ficus carica* L.): Pomological characteristics, nutritional value, and phytochemical properties. *European Journal of Horticultural Science*, 2018, vol. 83, no 2, p. 104-113.
- MAWA, Shukranul, HUSAIN, Khairana, et JANTAN, Ibrahim. *Ficus carica* L. (*Moraceae*): phytochemistry, traditional uses and biological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, vol. 2013.

-
- MAZORRA-MANZANO, Miguel A., MORENO-HERNÁNDEZ, Jesús M., et RAMÍREZ-SUAREZ, Juan C. Milk-clotting plant proteases for cheesemaking. *Biotechnological applications of plant Proteolytic enzymes*, 2018, p. 21-41.
 - MCGOVERN, Thomas W. Botanical Briefs: The Fig—*Ficus carica* L. *cutis*, 2002, vol. 69, no 5, p. 339-340.
 - MENDOZA, L. *et al.* Human Fungal Pathogens of Mucorales and Entomophthorales. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2015, 5(4):1-33.
 - METIN, Banu. Filamentous fungi in cheese production. *Microbial cultures and enzymes in dairy technology*, 2018, p. 257-275.
 - MICHEL, BOTINEAU. *Guide des plantes à fruits charnus comestibles et toxiques*. Lavoisier, 2015.
 - MORIN-SARDIN, Stephanie, NODET, Patrice, COTON, Emmanuel, *et al.* *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biology Reviews*, 2017, vol. 31, no 1, p. 12-32.
 - MÓTYÁN, János András, TÓTH, Ferenc, et TÖZSÉR, József. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 2013, vol. 3, no 4, p. 923-94.
 - NOUANI, A. *Recherche de succédanés de la présure traditionnelle utilisés dans la coagulation du lait*. (2009). Thèse de doctorat. Université de Boumerdes.
 - NOUANI, A., MOULTI-MATI, F., BELBRAOUE, S., *et al.* Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Mucor pusillus*: method comparison. *African Journal of Biotechnology*, 2011, vol. 10, no 9, p. 1655-1665.
 - PREETHA S. and BOOPATHY R., 1997. Purification and Characterization of a milk-clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *W.J. Microb. Biotechn.* 13: 673-678.
 - RAMET, J. P. Les agents de transformation du lait; la présure et les enzymes coagulantes In: *Le fromage*. Ed., A. Eck, 3ème ed., *Technique et documentation Lavoisier*, 1997, p. 101-107.
 - RANI, Kirti, RANA, Rachita, DATT, Sanchi, *et al.* Review on latest overview of proteases. *Int. J. Curr. Life Sci.*, 2012, vol. 2, no 1, p. 12-18.
 - RAO, Mala B., TANKSALE, Aparna M., GHATGE, Mohini S., *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 1998, vol. 62, no 3, p. 597-635.
 - RASOOL, Izza Faiz ul, AZIZ, Afifa, KHALID, Waseem, *et al.* Industrial Application and Health Prospective of Fig (*Ficus carica*) By-Products. *Molecules*, 2023, vol. 28, no 3, p. 960.

- RIBADEAU-DUMAS, B. Physicochimie et biochimie des protéines du lait. Données récentes. *Le Lait*, 1991, vol. 71, no 2, p. 133-139.
- SAIDI, F., & TOUAHRIA, L. (2021). *Optimisation des paramètres de coagulation du lait et essai de fabrication du fromage frais à base de lait en mélange par pepsine de poulet*. Thèse de doctorat.
- SALMA, Salma, SHAMSI, Yasmeen, ANSARI, Saba, *et al.* *Ficus carica* L.: a panacea of nutritional and medicinal benefits. *Cellmed*, 2020, vol. 10, no 1, p. 1.1-1.6.
- SATHYA, R., PRADEEP, B. V., ANGAYARKANNI, J., *et al.* Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2009, vol. 14, p. 788-794.
- SIAR, El-Hocine et ZIDOUNE, M. N. Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait. (2014).
- SIAR, El-Hocine, MORELLON-STERLING, Roberto, ZIDOUNE, Mohammed Nasreddine, *et al.* Use of glyoxyl-agarose immobilized ficin extract in milk coagulation: Unexpected importance of the ficin loading on the biocatalysts. *International journal of biological macromolecules*, 2020, vol. 144, p. 419-426.
- SILVA, S. V. et MALCATA, F. X. Partial identification of water-soluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: influence of type of coagulant and starter. *Journal of dairy science*, 2005, vol. 88, no 6, p. 1947-1954.
- SOUARÉ, Mamadou Lamarana, TRAORÉ, Lonseny, SIDIMÉ, Youssouf, *et al.* Utilisation de la pepsine de chinchard (*Trachurus mediterraneus*) dans la fabrication d'un fromage frais. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 2017, vol. 44, p. 64-69.
- STANLEY, D. W., EMMONS, D. B., MODLER, H. W., *et al.* Cheddar cheese made with chicken pepsin. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 1980, vol. 13, no 2, p. 97-102.
- TALANTIKITE NEE KHELLIL, Souad. *Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie*. (2015). Thèse de doctorat. Université de Boumerdes.
- TAVANO, Olga Luisa, BERENGUER- MURCIA, Angel, SECUNDO, Francesco, *et al.* Biotechnological applications of proteases in food technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018, vol. 17, no 2, p. 412-436.
- TROCH, Thibault, LEFÉBURE, Émilie, BAETEN, Vincent, *et al.* Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 2017, vol. 21.

- VILAIN, Anne. Christine., *et al.* What's milk?. *Revue Française d'Allergologie*, 2010, vol. 50, no 3, p. 124-127.
- VUILLEMARD, Jean-Christophe. *Science et technologie du lait*. Presses de l'Université Laval, 2018.
- WARD, O. P., RAO, M. B., et KULKARNI, A. *Proteases*, production. Elsevier, 2009, 495–511.
- WILLIAMS, Donald C., SGARBIERI, Valdemiro C., et WHITAKER, John R. Proteolytic activity in the genus *Ficus*. *Plant Physiology*, 1968, vol. 43, no 7, p. 1083-1088.
- WU, Tao, SUN, Le-Chang, DU, Cui-Hong, *et al.* Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*). *Food Chemistry*, 2009, vol. 115, no 1, p. 137-142.
- ZIDOUNE, M. N. et ADOUI, F. Extraction d'enzyme coagulant de lait à partir de proventricules de poulet. (2007). Mémoire de magister. Université de Mentouri Constantine. 64p.

Annexes

Annexe 1**Tableau A1:** Liste du matériel et des produits chimiques utilisés.

Réactif et les produits	Appareille
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃)	Etuve (Venticell)
Acide chlorhydrique (HCl)	Agitateur magnétique (Hotplate Stirrer)
Acide acétique	Centrifugeuse non réfrigérée (Sigma)
Hydroxyde de sodium (NaOH)	Bain Marie (Nüve Bath)
Acide citrique	Balance (Kern)
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	Hachoir à viande (Sonashi)
Phosphate de sodium Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Bain d'ultrasons (HD SELECTA)
acide lactique	pH-mètre (HANNAHI-2211)
Réactif de Folin-Ciocalteu	
Ethanol absolu	
Chlorure de sodium (NaCl)	
Acide trichloracétique (TCA)	
Caséine	
Bleu Brillant de Coomassie G250	
BSA	
Sulfate d'ammonium (NH ₄) ₂ SO ₄	
Acide ortho-phosphorique à 85%	

Un certain nombre de petits matériels appropriés a été également utilisé dans cette étude. Il s'agit de : béchers de différents volumes, burettes graduées, Erlenmeyers de 250 mL, éprouvettes graduées (10, 25, 100 mL), fioles jaugées (100, 250, 500 mL), micropipettes (100-1000 µL et 10-100 µL), spatule, tubes à essai stériles...etc.

Annexe 2

Préparation de milieu de culture, des réactifs et solutions tampon

1. Milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*) (g/L)

Pomme de terre.....	200
Glucose.....	20
Agar.....	15
Chloramphénicol.....	0,05
Amoxicilline.....	0,5
pH final.....	5,60± 0,2 (Guiraud, 2012).

2. Réactif de Bradford

BBC G-250.....	0,1 g
Ethanol absolu.....	50 mL
Acide ortho-phosphorique 85%.....	100 mL
Eau distillée.....	Jusqu'à 1000 mL

(Noble et Bailey, 2009)

3. Tampon phosphate de potassium (0,1 M; pH 5,5)

- Solution A: Phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) 0,2 M.
- Solution B: Hydroxyde de sodium (NaOH) 0,2 M.

Pour avoir un tampon à pH 5,5 ; 0,1 M : mélanger 25 mL de la solution A + 2,85 mL de la solution B, puis compléter le volume jusqu'à 100 mL.

4. Tampon citrate/phosphate de sodium (0,1 M)

- Solution A: Acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 0,1 M.
- Solution B: Phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4) 0,2 M.

Pour avoir un tampon avec le pH souhaité, mélanger un volume x de la solution A avec un volume y de la solution B, puis compléter jusqu'à 100 mL avec l'eau distillée (Stoll et Blanchard, 2009).

pH	x (mL)	y (mL)
4,0	30,7	19,3
5,2	23,3	26,7

Annexe 3

Courbes d'étalonnage

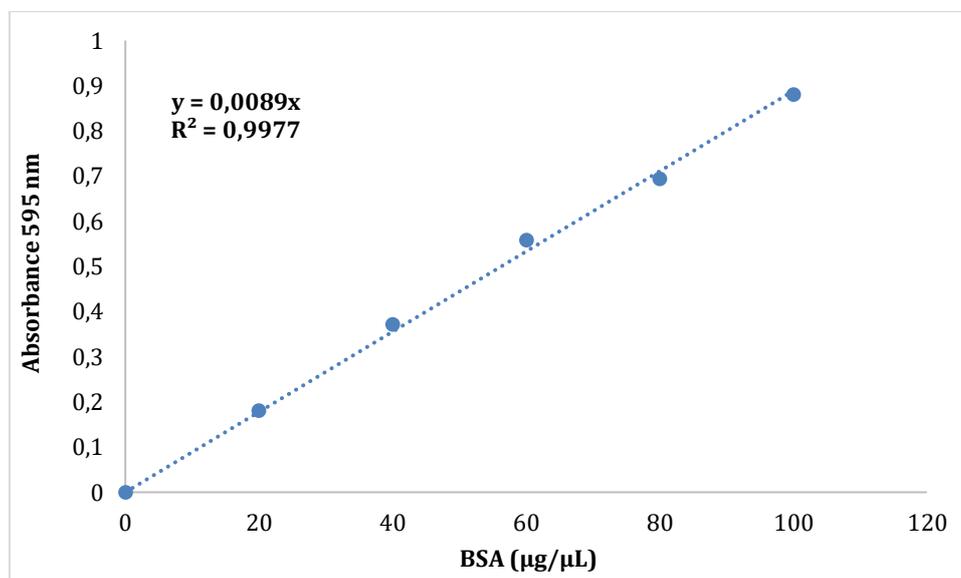


Figure A1. Courbe d'étalonnage de BSA (1 mg/mL) utilisée pour le dosage des protéines.

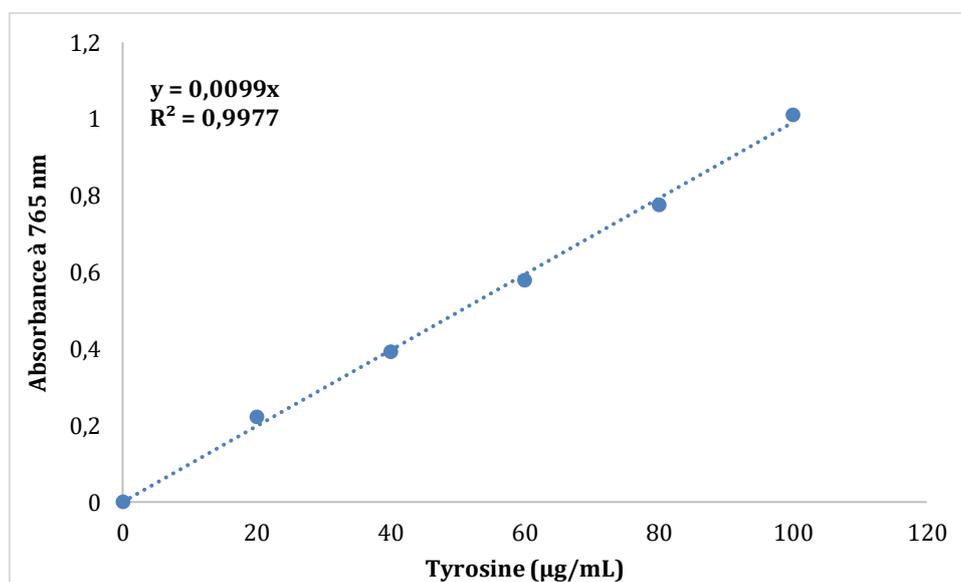


Figure A2. Courbe étalon de la tyrosine (0,1 mg/mL) établi pour le dosage de l'activité protéolytique.

Annexe 4

Budget de startup

Figure A3. Bilan de startup

								ACTIF
En milliers DZD	REALISATION			PREVISION				
	N-2	N-1	N	N+1	N+2	N+3	N+4	N+5
203/204/205/207 Immobilisation Incorporelles	-	-	-	-	-	-	-	-
Immobilisation Corporelles	-	-	-	3569587	4674279,3	5846162,2	7032405,4	8218648,6
Terrain				0	0	0	0	0
Bâtiment								
Autres Immobilisations Corporelles				3569587	4674279,3	5846162,2	7032405,4	8218648,6
Immobilisations en concession								
Immobilisation en cours	-	-	-	-	-	-	-	-
Immobilisations Financières	-	-	-	0	-	-	-	-
Titres mis en équivalence								
Autres participations et créances rattachées								
Autres Titres immobilisés								
Prets et autres titres financiers non courants								
Impôts différés actif								
ACTIF NON COURANT	-	-	-	3569587	4674279,3	5846162,2	7032405,4	8218648,6
Stocks et encours	-	-	-	2595949	4889149	7671949	9147949	9407149
Créances et emplois assimilés	-	-	-					
Clients				800000	1100000	1800000	2100000	5500000
Autres débiteurs								
Impôts et assimilés								
Autres créances et emplois assimilés								
Disponibilités et assimilés	-	-	-		-	-	-	-
Placements et autres actifs financiers courants								
Trésorerie				4560000	4635696	6940000	15248000	34012706
ACTIF COURANT	-	-	-	2595949	6208479,965	8786379,965	10687479,97	11371779,97
TOTAL ACTIF	-	-	-	11525536	15299124,3	22258111,2	33528354,4	57138503,6

PASSIF								
En milliers DZD	REALISATION			PREVISION				
	N -2	N -1	N	N+1	N+2	N+3	N+4	N+5
CAPITAUX PROPRES								
Capital émis				8180000	8180000	8180000	8180000	8180000
Capital non appelé								
Ecart de réévaluation								
Primes et réserves- Réserves Consolidées								
Résultat net- RN part du groupe				1087360,34	3384691,105	10192702,82	18392478,5	36252154,18
Autres capitaux propres- report à nouveau								
(1)Part de la société consolidante								
CAPITAUX PROPRES	-	-	-	9267360,34	11564691,11	18372702,82	26572478,5	44432154,18
PASSIFS NON-COURANTS								
Emprunts et dettes financières								
impôt différé passif								
Autres dettes non courantes								
Provisions et produits constatés d'avance								
PASSIFS NON-COURANTS	-	-	-	0	0	0	0	0
PASSIFS COURANTS								
Fournisseurs et comptes rattachés				2258175,66	3734433,195	3885408,385	6955875,905	12706349,42
Impôts								
Autres dettes								
Trésorerie passif								
PASSIFS COURANTS	-	-	-	2258175,66	3734433,195	3885408,385	6955875,905	12706349,42
TOTAL PASSIF	-	-	-	11525536	15299124,3	22258111,2	33528354,4	57138503,6
Verification de l'équilibre Actif/Passif	-	-	-	0	0	0	0	0

Annexe 5

Comptes de résultats escomptés

Figure A4. Comptes de résultat prévisionnel de startup

En Milliers DZD	REALISATION			PREVISION				
	N-2	N-1	N	N+1	N+2	N+3	N+4	N+5
Vente et produits annexes 70				4680000	10110000	19656000	31752000	46657500
Variation des stocks produits finis et en cours 72				2520000	5443200	8424000	10584000	11664000
Production immobilisée 73								
Subvention d'exploitation 74								
Production de l'exercice	-	-	-	7200000	15553200	28080000	42336000	58321500
Achats consommés 60				3035681	6494080,96	10655681	14817281	18978881
Services Extérieurs et autres consommations 61/62				768000	791000	1271000	1367000	1467000
Consommation de l'exercice	-	-	-	3803681	7285080,96	11926681	16184281	20445881
Valeur ajoutée d'exploitation	-	-	-	3396319	8268119,04	16153319	26151719	37875619
Charges de personnel 63				1952000	4416000	5376000	7056000	801600
Impôts et taxes et versement assimilés 64								
Excédent Brut d'Exploitation	-	-	-	1444319	3852119,04	10777319	19095719	37074019
Autres produits opérationnels 75								
Autres charges opérationnelles 65								
Dotations aux amortissements, Provisions 68				356958,7	467427,93	584616,22	703240,54	821864,86
Reprise sur pertes de valeurs et provisions 78								
Résultat opérationnel	-	-	-	1087360,3	3384691,11	10192702,8	18392478,5	36252154,2

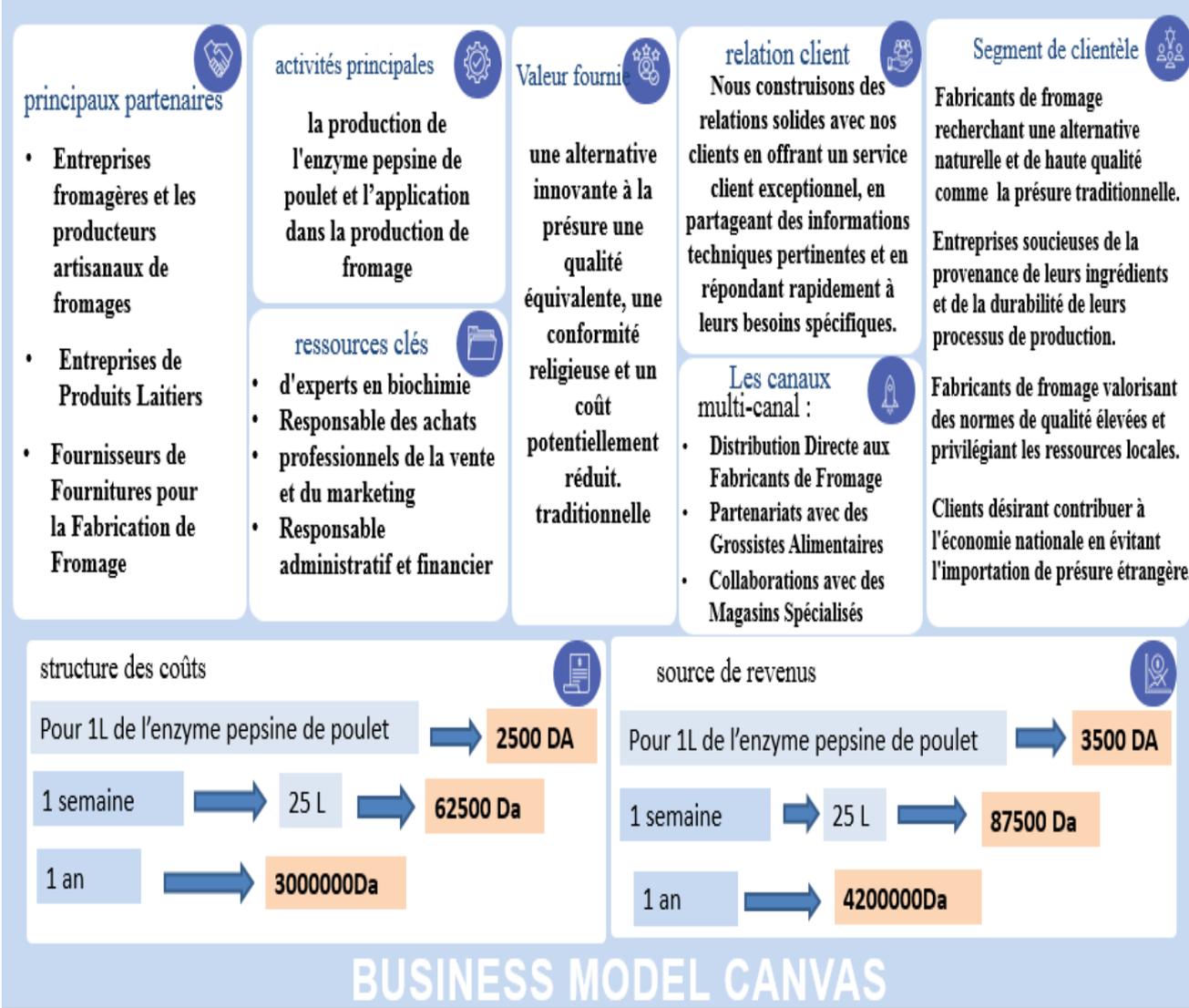
Annexe 6

Figure A5. Comptes su trésor

	N+1	N+2	N+3	N+4	N+5
Résultat net de l'exercice	1011411,34	3384691,11	10192702,8	18392478,5	36252154,2
Ajustements pour :					
- Amortissements et provisions	356958,7	467427,93	584616,22	703240,54	821864,86
- Variation des impôts différés					
- Variation des stocks	-2595949	-2293200	-2782800	-1476000	-259200
- Variation des clients et autres créances	-800000	-300000	-700000	-300000	-3400000
- Variation des fournisseurs et autres dettes	2258175,66	1476257,53	150975,19	3070467,52	5750473,5
- Plus ou moins-values de cession, nettes d'impôts					
<i>Flux de trésorerie générés par l'activité (A)</i>	230596,7	2735176,57	7445494,23	20390186,6	39165292,5
Flux de trésorerie provenant des opérations d'investissement - - - - -					

Annexe 7

Figure A6. Modèle d'affaire



Annexe 8

Figure A7. Les factures pro-forma de matériel de laboratoire biochimique



DARELMED
EURL

EURL DARELMED
importation de materiel medical

FACTURE PROFORMA N° : 0389/2023

Date 05/06/2023

RC : 15/00-0050036-B-16
IDF : 001615005003670
Art Imp : 15220511011
NIS : 001615220004172
AGENCE BANCAIRE : BDL, Agence 160 nouvelle ville
Tizi ouzou
N° DE COMPTE : 00500160400235320091-ccp bdl
380062 clé 29

CLIENT
SALMA

RC :
Id F :
NIS :
Art Imp :

Ref.	Désignation	Unité	Quantité	Prix unitaire	Tva %	Montant HT
HS.Z11.10L	DISTILLATEUR 10 LITRES Type : HS.Z11.10L Marque : FAITHFUL Origine : CHINE DISPONIBLE: 05 JOURS	Unité	1	80 000,00	19,00	80 000,00
EVO 3000	Spectrophotomètre model:evo 300 marque: BSI origine: Italy	Unité	1	354 000,00	19,00	354 000,00
NB 201D	Spectrophotomètre Model:NB 201 Marque:carenum origine china	Unité	1	196 350,00	19,00	196 350,00
WB-7-2	BAIN MARE 6.3 LITRES Type : WB-7-2 Marque : FAITHFUL Origine : CHINE	Unité	1	67 500,00	19,00	67 500,00
DK-2000IIL	bain marie inox 14.6 Litres avec pompe d'évacuation Type : DK-2000IIL Marque : FATHFUL Origine : CHINE	Unité	1	105 000,00	19,00	105 000,00
DK-2000IIL..	bain marie inox 22.5 Litres avec pompe d'évacuation Type : DK-2000IIL Marque : FATHFUL Origine : CHINE	Unité	1	118 000,00	19,00	118 000,00
SY-19L	BAIN MARE 19 LITRES EN PLEXY Model : SY-19L Marque : BIOBASE Origine : CHINE	Unité	1	1,00	19,00	1,00

PAGE -1/2-

EURL DARELMED, Locaux C et D, Immeuble N°12, Toukacht - Tizi rached
 TEL.: 026 41 98 85 / 0560 57 76 83 - FAX : 026 41 98 56 - Site Web : www.darelmed.com
 eMail : darelmed@gmail.com



SARL AMA ELECTRONIC

Equipements Scientifiques et Fournitures de Laboratoires

RC :2500-0071539817

Compte bancaire :038025010225011400125 ELSALAM BANK

FACTURE PROFORMA

CONSTANTINE le 02/05/2023

N° : MP/FP/00124/202

Code : COMPTOIRE
Client : COMPTOIRE
Adresse :
IF :
RC :
NI :
NIS :

N	REF	DESIGNATION	QTE	PUHT	TVA	MONTANT HT
1	MC.SMART.R	MICRO CENTRIFUGEUSE REFRIGEREE HANIL SCIENCE SMART R17	1.0	1 284 549,00	19,00	1 284 549,00
2	CENT.	CENTRIFUGEUSE OHAUS FC5707HR	1.0	477 164,00	19,00	477 164,00
3	UC152D	Agitateur magnetique chauffant 15 L / Marque : STUART Plateau Céramique 15x15cm Affichage Numérique Température - 450 C° UC152D	1.0	147 500,00	19,00	147 500,00
4	JSVX-7R	Agitateur vortex (Vortex Mixer JSVX- 7R)	1.0	38 700,00	19,00	38 700,00
5	PH.M.P.	PH-METRE PORTABLE TYPE TESTER APERA SMART PH60-z	1.0	51 603,00	19,00	51 603,00
6	PH.M.P	PH-METRE PORTABLE TYPE STYLO Princeton Instruments SX- 610PH 0-14.0 - Résolution : +/-0.1 - Livré en malette avec pile & Solution PH.	1.0	33 891,00	19,00	33 891,00
7	BM.09L.ZENIT	Bain marie 09L	1.0	78 000,00	19,00	78 000,00
8	MF.1000L	Micropipette fixe volume 1000L	1.0	6 760,00	19,00	6 760,00
9	BEP.1KGG	Balance électronique de précision portée 1Kg.précision 0.01g MT- LAB44	1.0	15 500,00	19,00	15 500,00
10	213-1121	BECHER FORM BASSE 50ML	1.0	381,00	19,00	381,00
11	BKT3-100-012	BECHER FORM HAUTE 100 ML	1.0	460,68	19,00	460,68
12	229.202.10	BECHER FORME BASSE 1000 ML1000 ML	1.0	1 298,70	19,00	1 298,70
13	229.202.07	Becher forme basse 250 ml	1.0	449,98	19,00	449,98
14	ERL.CL.100M	ERLENMEYER 100 ML COL LARGE (10 PCS)	1.0	4 003,00	19,00	4 003,00
15	ERL.CE.500M	ERLENMEYER 500 ML COL ETROIT (06PCS)	1.0	5 278,00	19,00	5 278,00
16	015.01.100	Eprouvette ISOLAB graduée base en verre classe A grad.bleues 100ml	1.0	1 700,00	19,00	1 700,00

Capital social :7 000 000,00

IF :001725007153949

AJ :25016211991

NIS :001725010001765

Tel :031.69.31.40

Fax :031.69.31.40

Mobile :05.61.94.42.59

Adresse :N°15 C06 Khazadar Abderrahmane (les palmiers) Ex. DNC.



SARL AMA ELECTRONIC

Equipements Scientifiques et Fournitures de Laboratoires

RC :2500-0071539817

Compte bancaire :03802501025011400125 ELSALAM BANK

FACTURE PROFORMA

CONSTANTINE le 02/05/2023

N° : MP/FP/00124/202

Code : COMPTOIRE
 Client : COMPTOIRE
 Adresse :
 IF :
 RC :
 AI :
 NIS :

N	REF	DESIGNATION	QTE	PUHT	TVA	MONTANT HT
17	T.ESS.12*100	TUBE A ESSAI EN VERRE BOROSIL 3.3 - 12X 100 MM (100 PCE)	1.0	4 453,52	19,00	4 453,52
18	PA.12T	PORTOIR ASSORTIE DE 12 TUBES DIFFERENTS DIAMETRES	1.0	1 891,00	19,00	1 891,00
19	PSN.D32.12T	PORTOIR 3 NIVEAUX POUR TUBE D. 32 MM - 12 TUBES	1.0	3 048,57	19,00	3 048,57
20	PA.60T	PORTOIR AUTOCLAYABLE & SUBMERSIBLE TUBE D.16 mm - 60 TUBES	1.0	1 965,15	19,00	1 965,15
21	135.303.01	Tube à centrifuger fond conique PP 15ml (10 pièces)	1.0	500,00	19,00	500,00

Proforma valide jusqu'au : 02/05/2023

Total Remise : 106 954,83

TOTAL HT :	2 032 141,77 DA
TOTAL TVA :	386 106,94 DA
TOTAL TTC :	2 418 248,71 DA
NET A PAYER :	2 418 248,71 DA

La présente facture pro-forma est Arrêtée à la somme de (en lettres):

DEUX MILLIONS QUATRE CENT DIX HUIT MILLE DEUX CENT QUARANTE HUIT DINARS ET SOIXANTE ET ONZE CENTIMES

Accusé De Réception

La Direction

Capital social :7 000 000.00

IF :001725007153949

AI :20010211991

NIS :001723010001703

Tel :031.69.31.40

Fax :031.69.31.40

Mobile :05.61.94.42.59

Adresse N°15 Cité Khaznadar Abderrahmane (ex palmiers) Es. DNC.

Annexe 9

Figure A8. Facture pro-forma des produits chimiques



PROCHIMA-SIGMA
Au service de la Science, la Santé et l'Industrie

N° 12, Rue SELKA BENALI, Tiemcer
Tel: 043 43 47 68
Fax: 043 43 47 68
Mail: contact@prochima-sigma.com
www.prochima-sigma.com

Tiemcer le, 03/07/23

Devis n° 60606



Client N°: CL2332
Particulier

Adresse :
E-mail :
Tél : **Fax :**

RC
AJ
NIF
NIS

Chargé clientèle
Nom et prénom : Mme Zidani Faiza
Tél : 0555-08-53-87
Email: faizazidani@prochima-sigma.com

Afin de confirmer la prise en compte de votre bon de commande, veuillez réclamer votre Accusé de Commande

Reference	Désignation	Disponibilité	Unité	Qté	Px unitaire	Montant HT
1091371000	Sodium hydroxide solution 1mol/1N		1 L	1,00	12 800,00	12 800,00
SP233114H-1	Citric acid monohydrate	DIS	1KG	1,00	1 750,00	1 750,00
SP204276-1KG	Sodium phosphate dibasic anhydrous puriss	DIS	1 KG	1,00	2 300,00	2 300,00
1064041000	Sodium chloride for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur		1 KG	1,00	1 850,00	1 850,00
SP223468-1KG	SODIUM HYDROXIDE Pellets, puriss quality	DIS	1KG	1,00	2 880,00	2 880,00
30721-2.5L	HYDROCHLORIC ACID MIN. 37 %, PE BOTTLE,R. G., REAG. ISO, REAG. PH. EU	DIS	2.5L	1,00	2 900,00	2 900,00
223484-500G	SODIUM CARBONATE, 99.95-100.05%, A.C.S.		500G	1,00	11 500,00	11 500,00
A4915-500G	AMMONIUM SULFATE ACS REAGENT		500G	1,00	10 500,00	10 500,00
8223421000	TRICHLOROACETIC ACID FOR SYNTHESIS			1,00	10 950,00	10 950,00
1090010500	Folin-Ciocalteu's phenol reagent			1,00	24 500,00	24 500,00
1064481000	Sodium citrate tribasic dihydrate			1,00	5 800,00	5 800,00
1022440100	CASEIN FOR BIOCHEMISTRY			1,00	50 700,00	50 700,00
A3912-10G	BOVINE SERUM ALBUMIN, HEAT SHOCK FRACT&		10G	1,00	15 480,00	15 480,00
A reporter						153 910,00

Société Générale: 021 00401 113 00 19 808/07
CPA: 004 00408 400 00 12 948/03

NIF: 001013026401461
NIS: 0 010.1301 00136 74

RC: 10 b 0264014-13/00
AJ: 1301 61 29 942

Reference	Désignation	Disponibilité	Unité	Qté	Px unitaire	Montant HT
					Report	153 910,00
27815-25G-F	COOMASSIE(R) BRILLIANT BLUE G 250 COOMASSIE(R) BRILLIANT BLUE G 250 C	DIS	25G	1,00	18 600,00	18 600,00
SP0099AB-2.5L	Ethanol Absolu	DIS	2.5L	1,00	2 790,00	2 790,00
1005731000	ortho-Phosphoric acid 85% for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur	DIS	1L	1,00	3 950,00	3 950,00
E.D-5L	Eau distillée 5L		5L	1,00	180,00	180,00
				Total HT	TVA 19%	Total TTC
				179 430,00	34 881,70	213 521,70

Résumés

Résumé

Cette étude vise à évaluer le pouvoir coagulant de certaines enzymes extraites à partir du latex de figuier (*Ficus carica* L.), de proventricules de poulet (*Gallus gallus*) et des cultures de *M. circinelloides* sur milieu solide, ainsi de déterminer si ces enzymes, sous une forme partiellement purifiées, pourraient être utilisées comme alternatives à la présure commerciale importée dans la fabrication du fromage frais et Camembert. L'extrait des proventricules de poulet exprime une activité coagulante de l'ordre de $973,333 \pm 23,09$ US/mL, tandis que l'extrait de latex de figuier présente une activité plus élevée de $4260,651 \pm 43,40$ US/mL. L'extrait brut de *M. circinelloides* exerce une activité coagulante moyenne de $1533,333 \pm 57,73$ US/mL. L'application de l'étape de pré-purification basée sur la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium et la dialyse a permis une amélioration de la pureté, le rendement en activité et le rapport AC/AP de l'extrait lyophilisé de pepsine et de *M. circinelloides*. Des résultats moins efficaces ont été notés pour l'extrait de la ficine. Les données obtenues ont révélé que l'extrait lyophilisé de pepsine de poulet présente des propriétés technologiques proches de celles de la présure commerciale, assurant l'obtention d'un rendement fromager, un goût et une texture des fromages comparables. Ces résultats ouvrent la voie à des essais semi-industriels et suggèrent la possibilité de substituer l'enzyme commerciale par des enzymes locales pour une production fromagère durable et adaptée aux pratiques locales.

Mots-clés: protéase, agent coagulant, *Ficus carica* L., pepsine de poulet, *M. circinelloides*, fromage.

Abstract

This study aims to evaluate the milk-clotting activity of some enzymes extracted from fig latex (*Ficus carica* L.), chicken proventriculi (*Gallus gallus*) and cultures of *M. circinelloides* on solid medium, and to determine if these enzymes, in a pre-purified form, could be used as an alternative to the commercial rennet in the manufacture of fresh and Camembert cheeses. The extract of chicken proventriculus exhibited a milk-clotting activity of 973.333 ± 23.09 SU/mL, while the extract of fig latex had a higher activity of 4260.651 ± 43.40 SU/mL. The crude extract of *M. circinelloides* exhibited an average milk-clotting activity of 1533.333 ± 57.73 SU/mL. Application of the pre-purification step using differential precipitation with ammonium sulphate and dialysis allowed an improvement of the purity, the activity yield and the MCA/PA ratio of the freeze-dried extracts of pepsin and *M. circinelloides*. Less effective results were noted for the ficin extract. The obtained data revealed that the freeze-dried extract of chicken pepsin had technological properties close to those of the commercial rennet, ensuring the obtaining of comparable cheese yield, taste and texture of cheeses. These results pave the way for semi-industrial trials and suggest the possibility of replacing the commercial enzyme with local enzymes for sustainable cheese production adapted to local practices.

Key words: protease, coagulant, *Ficus carica* L., chicken pepsin, *M. circinelloides*, cheese.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم قوة التخثر لبعض الإنزيمات المستخرجة من لاتكس التين (*Ficus carica* L.) و بروفنتريكولي دجاج (*Gallus gallus*) ومزارع *M. circinelloides* على وسط صلب، وتحديد ما إذا كانت هذه الإنزيمات في صورة منقاة جزئياً يمكن استخدامها كبديل للمنفعة التجارية المستوردة في صناعة الجبن الطازج وجبن الكمبيري. عبر مستخلص بروفنتريكولوس الدجاج عن نشاط تخثر يبلغ 973.333 ± 23.09 SU/مل، في حين أن مستخلص لاتكس شجرة التين له نشاط أعلى يبلغ 4260.651 ± 43.40 SU/مل. مارس المستخلص الخام لـ *M. circinelloides* نشاط تخثر متوسط يبلغ 1533.333 ± 57.73 SU/مل. تطبيق خطوة ما قبل التنقية على أساس الترسيب التفاضلي مع كبريتات الأمونيوم ودياليز سمح بتحسين النقاء، وإنتاجية النشاط ونسبة AC/AP لمستخلص البيبين المجفف بالتجميد و *M. circinelloides*. ولوحظت نتائج أقل فعالية لمستخلص الفيسين. كشفت البيانات التي تم الحصول عليها أن مستخلص بيبين الدجاج المجفف بالتجميد له خصائص تكنولوجية قريبة من خصائص المنفعة التجارية، مما يضمن الحصول على محصول جبن وطعم وملامس من الجبن المماثل. تمهد هذه النتائج الطريق لتجارب شبه صناعية وتشير إلى إمكانية استبدال الإنزيم التجاري بإنزيمات محلية لإنتاج الجبن المستدام المتكيف مع الممارسات المحلية.

الكلمات المفتاحية: البروتياز، المخثر، *Ficus carica* L.، بيبين الدجاج، *M. circinelloides*، الجبن.