



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER**

**Domaine : SNV**      **Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Analyses Biologiques et Biochimiques**

**Présenté par :**

**BOUACHERINE Messaouda & OUCHENE Zahra**

***Thème***

***Valorisation d'un savoir faire Kabyle pour son application industrielle: Caractérisation d'un fromage à pâte molle fabriqué à partir du lait de vache coagulé avec l'enzyme du Ficus carica L.***

**Soutenu le : 03/ 07 / 2017**

**Devant le jury composé de :**

<b><i>Nom et Prénom</i></b>	<b><i>Grade</i></b>		
Mme. Tighidet Salima	MCA	Univ. de Bouira	Président
Mme. Mazri Chafiaa	MCB	Univ. de Bouira	Promoteur
M. Siar Hocine	MAB	Univ. de Constantine	Co-Promoteur
M. Iazzourene Ghania	MAB	Univ. de Bouira	Examineur

**Année Universitaire : 2016/2017**

## **Remerciements**

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

*Nos remerciements s'adressent en premier lieu à notre promotrice madame MAZRI Chafiaa pour le sujet et le temps qu'elle nous a attribué et d'avoir accepté de diriger notre travail, pour ses précieux conseils et orientations, sans oublier sa patience.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à Monsieur SIAR Hocine pour ses conseils, ses orientations et surtout pour nous avoir accueilli au niveau du laboratoire de la nutrition et technologies alimentaires (LNTA) de l'INATAA à Constantine et mis à nous disposition tous les moyens nécessaires afin de réaliser une importante partie de ce travail.*

*Nous exprimons nos respectueux remerciements à Mme Tighidete Salima d'avoir accepté de présider le jury et Mme IAZZOURENE Ghania d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous remercions la laiterie de la vallée ainsi que l'ensemble de son personnel pour nous avoir accueilli et permis d'effectuer les différents tests et analyses et pour avoir mis à nous disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation d'une partie de ce travail.*

*On est reconnaissant aussi envers tous ceux et celles qui, de loin ou de près ont contribué à la réalisation de ce mémoire, trouvent ici notre estime, notre sympathie ainsi que nos vifs remerciements.*

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



## *Dédicace*

### *A ma très chère mère*

*Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance.*

*Tu as fait plus que mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.*

*Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

### *A mon Père*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.*

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis pour mon éducation et mon bien être.*

### *A mon très cher frère Madjid*

*Mon cher frère, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.*

*Mon ange gardien et mon fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse.*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

### *A mon très cher frère Achour*

*Mon cher frère présent dans tous les moments difficiles par son soutien moral et ses belles surprises sucrées.*

*Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

*Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.*

### *A ma très chère soeur Dahbia*

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.*

*Je vous remercie pour votre affection si sincère.*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*A ma chère binome Zahra et sa famille*

*A toutes celles et à tous ceux qui m'aiment.*

## *Dédicace*

*À ma mère (yemma 3zizen),*

*Aucune dédicace ne serait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous m'avez portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie*

*À MON Cher père*

*En reconnaissance aux sacrifices consentis avec dévouement pour mon éducation et ma formation, pour votre soutien financier, moral et humain tout au long de mes études et de ma vie vous restez toujours une référence*

*à mes yeux*

*À mes chers frères et leurs femmes*

*Da Bouhou et foufa, Da Moussa et nounou, Lhacen et warda, Khalil et filla, Faheme et ziri*

*À ma charmante et chère sœur*

*Na Malika et ces enfants : slimane, rahim, abed el haq et abed al moumen*

*À la personne la plus chère à mon cœur et la plus précieuse à mes yeux :*

*mima*

*À: Hakim, Lilia, Yacine, Rayene, Housseem, Tinhinane, Lyza, Adem, maryem isslam*

*À ma chère binome Missou et sa famille*

*À toutes mes amies: Chafia, Hakima, Baya, Dihia, Soriya, Joujou, Chahra, Siham, Amel, Zohra*

*Et toutes les autre.*

*Zahra*

# Sommaire

---

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

Introduction.....	01
-------------------	----

## Synthèse bibliographique

I. Figuier .....	03
I.1. Généralité sur le figuier.....	03
I.1.1. Position systématique du figuier.....	03
I.1.3. Aspect physiologique de figuier .....	03
I.2. Généralités sur le Latex .....	04
I.2.1. Caractéristiques de la Ficine.....	04
I.2.2. Utilisation de la Ficine.....	05
I.2.3. Mécanisme d'action de la Ficine.....	06
II. Lait.....	06
II.1. Définition de lait .....	06
II.2. Composition de lait.....	07
II.2.1. L'eau .....	07
II.2.2. Le lactose.....	07
II.2.3. Matière grasse.....	07
II.2.4. Matières azotés.....	08
II.2.4.1. Azote protéiques.....	08
II.2.4.2. Azote non protéique (ANP).....	08
II.2.5. Autres composants.....	08
II.2.5.1. Matière minérale et saline.....	08
II.2.5.2. Vitamines.....	08
II.3. Généralités sur les caséines.....	09
II.3.1. Composition et structure chimique.....	09
II.3.2. Micelle de caséine.....	10
III. Fromage.....	12
III.1. Définition de fromage.....	12
III.2. Les différents types de fromage.....	12
III.3. La technologie des fromages a pâte molle exemple camembert.....	13
III.3.1. Définition des fromages à pâte molle.....	13

# Sommaire

---

III.3.1.1. Fromage de pâte molle à croûte fleurie.....	14
III.3.1.2. Fromage de pâte molle à croûte lavée.....	14
III.3.1.3. Fromage de pâte molle a croûte persillée ou bleus .....	14
III.3.2. Procédé de fabrication des fromages à pâte molle type camembert.....	15
III.3.2.1. La standardisation.....	15
III.3.2.2. La coagulation de lait.....	15
III.3.2.3. L'égouttage.....	18
III.3.2.4. Salage.....	18
III.3.2.5. L'affinage.....	18

## **Partie expérimentale**

### **I. Matériel et méthodes**

I.1. Matières premières.....	20
I.1.1. Le lait.....	20
I.1.2. La ficine .....	21
I.1.3. Caséine.....	22
I.2. Caractérisation physico-chimique de l'extrait enzymatique obtenu.....	22
I.2.1. Mesure de la teneur en matière sèche.....	22
I.2.2. Mesure du pH.....	23
I.2.3. Dosage de la teneur en protéines dans la solution enzymatique.....	23
I.3. Mesure de l'activité enzymatique de la ficine.....	24
I.3.1. Evaluation de l'activité coagulante.....	25
I.3.2. La force coagulante.....	26
I.3.3. Détermination de l'activité protéolytique.....	27
I.3.4. Activité spécifique.....	29
I.4. Détermination des conditions optimales d'activité d'extrait brut de ficine et de présure microbienne.....	29
I.4.1. Température optimale.....	29
I.4.2. pH optimal.....	30
I.4.3. Concentration du lait en CaCl <sub>2</sub> .....	30
I.5. Le processus de la fabrication d'un fromage à pâte molle type « Camembert » à la laiterie de la vallée de Tazmalt.....	30
I.5.1. La technologie de fabrication de Camembert au niveau de SARL laiterie .....	30
I.6. Les ferments lactiques et les sels utilisés au cours de la fabrication de camembert....	38

# Sommaire

---

I.7. Prélèvement et préparation des échantillons .....	38
I.8. Analyse physico-chimiques du lait et de fromage (normes AFNOR, 1980).....	39
I.9. Analyses microbiologiques.....	41
I.9.1. Les germes recherchés dans le lait de vache pasteurisé et dans le camembert.....	41
I.9.2. Dénombrement des germes recherchés.....	42
I.10. Dénombrement des germes recherchés.....	45
I.10. Suivi de l'évolution de la texture.....	45
I.11. Analyse sensorielle.....	46

## II. Résultats et discussion

II.1. Caractéristiques physicochimiques du lait utilisé.....	47
II.2. Caractéristiques de l'extrait enzymatique.....	47
II.2.1. Activité protéolytique.....	49
II.3. Conditions optimales de coagulation.....	50
II.3.1. Effet de pH.....	50
II.3.2. Effet de la température.....	51
II.3.3. Effet de la concentration en CaCl <sub>2</sub> .....	52
II.4. Essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type « Camembert ».....	53
II.4.1. Caractéristiques physicochimiques du lait utilisé de lait pasteurisé et de lactosérum.....	53
II.4.2. Résultats de l'évolution du « camembert » au cours de la phase d'affinage.....	54
II.4.2.1. Paramètres physicochimiques de « camembert ».....	54
II.5. Analyses microbiologiques.....	56
II.5.1. Résultats des analyses microbiologiques de lait pasteurisé .....	56
II.5.2. Résultats des analyses microbiologiques de camembert .....	56
II.6. Test de pénétrométrie.....	57
II.7. Caractéristiques organoleptiques.....	57
Conclusion.....	60

Références bibliographiques

Annexes

Résumé



# Sommaire

---

## Liste des abréviations

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**A<sub>w</sub>** : Water activité

**ANP** : Azote nonprotéique

**CF** : Coliforme fécaux

**CMP** : Caséinomacropéptide

**CSR** : Clostridium sulfito-réducteur

**CT** : Coliforme totaux

**CCP** : phosphates de calcium colloïdal

**EST** : Extrait sec totale

**ESD** : Extrait sec dégraissé

**ISO** : International Standard Organization

**MG** : Matière grasse

**MS** : Matière sèche

**ONIL** : Office National Interprofessionnel du Lait

**SARL** : Société à responsabilité limitée

**SBA** : sérum albumine bovine

**SM** : Solution mère

**PCK** : Para-Caséine-Kappa

**pH** : Potentiel hydrogène

**TCA** : Acide trichloracétique

**UP** : Unité présure

**U.A.C** : Unité d'activité coagulante

**US** : Unité soxhlet

**VF** : Gélose viande foie

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Micelle de caséine vu par un microscope électronique.....	10
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique de la micelle de caséine.....	11
<b>Figure 3</b> : Structure d'une micelle de caséine stable.....	11
<b>Figure 4</b> : Phase de la coagulation enzymatique de lait.....	17
<b>Figure 5</b> : Diagramme de fabrication des fromages à pâte molle.....	19
<b>Figure 6</b> : Préparation de substrat standard (poudre de lait reconstitué).....	20
<b>Figure 7</b> : Collection de latex.....	21
<b>Figure 8</b> : Diagramme d'extraction de l'extrait brut de la ficine.....	22
<b>Figure 9</b> : Courbe étalon $DO = f [B.S.A]$ pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et al (1951).....	24
<b>Figure 10</b> : Mesure de temps de floculation par la méthode de Brridge 1945.....	26
<b>Figure 11</b> : Protocole de dosage de l'activité protéolytique.....	28
<b>Figure 12</b> : Courbe d'étalonnage $DO = f [Tyr]$ pour l'activité protéolytique.....	29
<b>Figure 13</b> : Tank isotherme.....	31
<b>Figure 14</b> : Découpage de caillé avec des tranches caillé.....	32
<b>Figure 15</b> : Brassage et délactosage de caillé.....	33
<b>Figure 16</b> : Etape de moulage de camembert.....	33
<b>Figure 17</b> : Salage de camembert dans la saumure.....	35
<b>Figure 18</b> : Etape de l'affinage de camembert.....	35
<b>Figure 19</b> : Diagramme de fabrication du fromage à pâte molle type «camembert» à SARL laiterie la vallée de Tazmalt - Bejaia.....	37
<b>Figure 20</b> : Protocole expérimentale pour le dénombrement des CT dans le lait pasteurisé.....	43
<b>Figure 21</b> : Protocole expérimentale pour le dénombrement des CT dans le camembert.....	44
<b>Figure 22</b> : Préparation de l'échantillon pour le test de pénétrométrie.....	46

<b>Figure 23</b> : Quantité des produits d'hydrolyse libérés par l'extrait enzymatique étudié et la présure.....	49
<b>Figure 24</b> : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de la ficine et de la présure.....	51
<b>Figure 25</b> : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la ficine et de la présure.....	52
<b>Figure 26</b> : Effet de la concentration en $\text{CaCl}_2$ sur l'activité coagulante de la ficine et de la présure.....	53
<b>Figure 27</b> : Profil sensoriel des fromages au 15 <sup>ème</sup> jour d'affinage.....	58

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Principales caractéristiques des caséines.....	09
<b>Tableau 2 :</b> Les différents types de fromage.....	12
<b>Tableau 3:</b> Caractéristiques physicochimiques de la poudre de lait et du substrat de Berridge.....	47
<b>Tableau 4 :</b> Caractéristiques de l'extrait brut du latex de <i>Ficus carica</i> .....	48
<b>Tableau 5 :</b> Composition physicochimique du lait crû utilisé pour la fabrication fromagère.....	53
<b>Tableau 6 :</b> Composition physicochimique de lait pasteurisé.....	54
<b>Tableau 7 :</b> Les résultats des analyses physicochimiques de lactosérum au cours de l'égouttage.....	54
<b>Tableau 8 :</b> Les paramètres physico-chimiques des fromages obtenus.....	56
<b>Tableau 9 :</b> Résultats des analyses microbiologiques de lait pasteurisé.....	56
<b>Tableau 10:</b> Résultats des analyses microbiologiques de fromage issu de la coagulation par la ficine et par la présure commerciale.....	57

Les enzymes sont actuellement largement utilisées comme auxiliaires technologiques. 60% de ces enzymes sont des protéases (Dicko, 2016). Ces derniers sont les catalyseurs les plus efficaces et les plus recherchés et jouent un rôle important en biotechnologie, particulièrement en industries alimentaires. Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases. En effet, ce sont des enzymes qui catalysent les protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique. Ces enzymes ont été utilisées dans des applications extrêmement variées telles que l'attendrissage de viande et la fabrication des fromages. Ces protéases ont plusieurs origines microbiennes, animales ou encor végétales tel que la ficine obtenue à partir de latex du figuier.

La Ficine, est le nom donné pour l'enzyme protéolytique (endopeptidase) isolée à partir de latex des arbres du genre *Ficus*. Elle appartient à la famille des protéases à cystéine (Azarkan *et al.*, 2011 ; Zare *et al.*, 2013).

Le latex du figuier qui contient la ficine est employé depuis les périodes antiques pour la fabrication des fromages ou comme un antihelminthique (Feijoo-siota *et al.*, 2014). La ficine est aussi utilisée pour l'attendrissement de la viande (Grzonka *et al.*, 2007). Traditionnellement, dans les montagnes d'Algérie, particulièrement la Kabylie, le latex de figuier (ficine brute) est utilisé comme agent coagulant pour la préparation d'un fromage connu sous le nom *AGUGLI*.

Il existe essentiellement deux types de coagulation, l'une lactique, est réalisée à l'aide de ferments lactiques par dégradation du lactose en acide lactique, et l'autre enzymatique par protéolyse des caséines par des enzymes de différente origine. Les industries fromagère utilisent la présure comme agent coagulant qui est obtenue traditionnellement à partir de la caillette de jeunes veaux non sevré elle est vendu sous forme de poudre, et elle est constituée de 80 % de chymosine et 20% pepsine (Collin, 2015).

Durant ces dernières décennies, il a été observé une pénurie mondiale en présure pour des raisons zootechniques et économiques parce qu'elle a connu une demande accru à cause d'une augmentation régulière de la production mondiale du fromage. Raison pour laquelle des recherches ont été activement poussées dans le but de trouver de nouvelles sources potentielles d'enzymes qui pourront être substituées à la présure animale (Banga-mboko *et al.*, 2002).

Parmi ces succédanés, les plus anciens on en trouve les protéases d'origine végétale employées dans des préparations traditionnelles telles que celles provenant, du chardon, ou du latex de figuier et de la papaine. Pour pallier à ce déficit en présure, d'autres enzymes ont été envisagées telles que les protéases d'origine fongique synthétisées par *Mucor pusillus* et *Endothia parasitica*. il existent aussi des succédanés d'origine animale tels que les pepsines porcine, les protéases gastriques d'animaux marins et les pepsines extraites des proventricules de volailles (Boughellout, 2007).

L'enzyme qui a fait l'objet de ce travail est extraite à partir de latex des figuiers (*Ficus carica*) dans la zone d'Ahl el ksar et Taqarbouzth wilaya de Bouira.

L'objectif principale de cette étude est la valorisation du savoir faire ancestrale comme pratiques traditionnelles des pasteurs Kabyles qui fabriquaient leur fromage frais sur place durant le pâturage en utilisant le lait de chèvre, par la caractérisation de l'extrait brut de latex "la ficine", ainsi que l'étude de la possibilité de son emploi comme succédanés de présure dans l'industrie fromagère pour fabriquer le fromage à pate molle "le camembert". Pour atteindre cet objectif nous avons fixé des objectifs secondaires :

- Extraction et caractérisation de la ficine du latex du figuier *Ficus carica L.*;
- Utilisation de cet extrait étudié dans la fabrication d'un fromage à pâte molle type « Camembert », et sa comparaison avec celui obtenu avec la présure microbienne;
- Caractérisation physico-chimique, biologique et sensorielle du camembert obtenu.

## I. Le figuier

### I.1. Généralité sur le figuier

Le figuier est un arbre de la famille des Moraceae à feuilles caduques et une espèce diploïde ( $2n = 26$ ) dont le nom botanique est *Ficus carica* L, a un qualificatif générique qui signifie verrier pour *Ficus* et *carica* fait allusion à une région en Turquie (Oukabli, 2003).

#### I.1.1. Position systématique du figuier

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

**Embranchement :** Phanérogames

**Sous embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Dicotylédones

**Sous classe :** Hamamélidées

**Série :** Apétales unisexuées

**Ordre :** Urticales

**Famille :** Moraceae

**Genre :** *Ficus*

**Espèce :** *Ficus carica* L.

#### I.1.2. Origine et répartition géographique

Le figuier est un arbre fruitier très anciennement connu dans le monde, son origine reste un peu confus. Selon Vidaud 1997, le figuier est probablement originaire du Moyen Orient et naturalisé dans plusieurs régions et surtout celles du pourtour du bassin méditerranéen dont il fournit l'essentiel de la production mondiale. Cet arbre, au passé mythique et nommé *Ficus carica*, cette espèce a été cultivée par les phéniciens, les syriens, les égyptiens et les grecs dans tout le bassin méditerranéen (Vilmorin, 2003).

#### I.1.3. Aspect physiologique de figuier

*Ficus carica* possède une étonnante capacité de régénération végétative et de production de fruit sans production de fleurs visibles. Le figuier possède deux espèces les bifères avec



deux production : figes de première récolte ou figes fleurs (El bakkor) et figes de deuxième récolte ou figes d'automne (karmouce) et les unifères avec une seule production.

L'évolution des figes fleurs ne nécessite pas de pollinisation et se fait d'une manière parthénocarpique (Vidaud, 1997 et Oukabli, 2003).

## **I.2. Généralités sur le Latex**

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

Il est connu depuis des années que le latex de genre *Ficus* contient une activité protéolytique. Le nom ficine a été découvert par Robbins (1930) pour la poudre blanche purifiée dotée d'une activité antihelminthique obtenu à partir de latex de genre *Ficus* (Leulmi, 2016).

Au fait, c'est en 1992 que l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire a recommandé le nom ficaine pour la « composante majeure protéolytique du latex du figuier » le latex est une suspension aqueuse de couleur blanche, il est largement distribué dans la plante (Kim *et al.*, 2008).

Ce liquide contient divers métabolites secondaires comme les composés phénoliques et des protéines à savoir les protéases à cystéine (Agrawal et Konno, 2009). Le latex est constitué de caoutchouc, résine, albumine, sucre et acide malique, enzymes protéolytiques, diastase, estérase, lipase, catalase et peroxydase (Joseph et Raj, 2011).

Par incision du tronc on recueille le latex qui coagule rapidement : filtré puis desséché, il constitue la ficine brute. Elle peut être utilisée par l'industrie agroalimentaire pour l'attendrissement des viandes et la coagulation de lait (Lansky, 2008).

### **I.2.1. Caractéristiques de la Ficine**

La ficine ou ficaine (EC 3.4.22.3) est une endopeptidase appartient à la famille des protéases à cystéine, isolée à partir de latex des arbres du genre *Ficus* (Julio, 2007).

Les informations disponibles indiquent que la ficine a beaucoup de propriétés communes avec la papaine, une figue verte pesant 10-15 g contient environ 100 à 150 mg de protéases (Devaraj *et al.*, 2011).

La séquence d'acides aminés déterminée pour les résidus du site actif ressemble de près à la séquence correspondante dans la papaine elle contient 210 acides aminés pour un poids moléculaire compris entre 20 et 35 KDa (Devaraj *et al.*, 2008, 2011).

Son site actif est constitué de deux acides aminés qui sont la cystéine (Cys-25) et l'histidine (His-159). (Katsaros *et al.*, 2009).

C'est une endopeptidase activée par les thiols et les réducteurs (cystéine, thiosulfate, glutathion), elle est inactivée par les ions métalliques, les oxydants et les réactifs qui réagissent avec les thiols. Le fractionnement et la purification par chromatographie échangeuse d'ion a donnée 5 isoformes de ficine (A, B, C, D1 et D2) selon leur ordre de l'éluion. L'autolyse de la ficine peut donner des peptides qui ont des poids moléculaires compris entre 14 et 18 KDa.

La ficine présente une grande stabilité thermique. Sa température d'activité est comprise entre 45 à 55 ° C. L'activité maximale de la ficine est obtenue dans une gamme de pH de 5 à 8, elle est active à des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 8,5 avec une activité optimale à pH 7 l'inactivation complète de la ficine se produit en dessous de pH 3, ainsi que la dénaturation induite par le pH, conduit à un état partiellement plié à un pH acide (Devaraj *et al.*, 2008, Azarkane *et al.*, 2011).

### **I.2.2. Utilisation de la Ficine**

Les protéases végétales ont été employées depuis les périodes antiques. On indique que le latex du figuier est utilisé pour la fabrication du fromage et comme un antihelminthique, il est aussi utilisé pour l'attendrissement de la viande (Fadyloglu, 2001). En Italie, la ficine est utilisée pour la fabrication d'un fromage traditionnelle le Cacioricotta (Siar, 2014).

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

### **I.2.3. Mécanisme d'action de la Ficine**

Les protéases à cystéine du latex, sont aussi connu comme des protéases à thiol, le mécanisme catalytique de ces enzymes impliquent un groupe de cystéine dans le site actif (Gonzalez *et al.*, 2011). La ficine a une large spécificité d'hydrolyse des liaisons contenant

des acides aminés non chargés, aromatiques et/ou hydrophobes, le mécanisme d'action de la ficine est similaire à celui de la chymosine, la phase primaire ou enzymatique correspond à une attaque de l'enzyme sur la composante qui stabilise la micelle, c'est-à-dire que l'enzyme hydrolyse la caséine- $\kappa$  au niveau de la liaison Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>, la chaîne peptidique se trouve ainsi coupée en deux segments inégaux : le segment 1-105 est la Para-Caséine-Kappa ou PCK et le segment 106-169, le Caséinomacropéptide ou CMP. La PCK liée aux caséines  $\alpha$  et  $\beta$  reste intégrée à la micelle hydrophobe et le CMP contenant tous les glucides est libéré et passe dans le lactosérum. Lors de la libération du CMP, il se produit une diminution importante de la charge électrique des micelles et de leur degré d'hydratation : deux facteurs de stabilité se trouvent ainsi atteints.

La phase secondaire dite agglomération, les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes. Les ions calcium s'uniraient à la partie chargée négativement des micelles, diminuant ainsi les répulsions électrostatiques auxquelles elles sont soumises et favoriseraient ainsi leur agrégation (Carole, 2002 et Leulmi, 2016)

## **II. Lait**

### **II.1. Définition de lait**

La première définition du lait apparaît en 1908, au Congrès international de la répression des fraudes de Paris. Le mot « lait » a été défini comme : « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. (Bénédictte, 2012). Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir du colostrum (Harmani, 2008).

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles mammifères après la naissance du jeune. C'est un liquide de composition complexe, blanc et opaque, d'une saveur douce, d'une réaction ionique (pH) voisin de la neutralité (Hadj abd rahman, 2014).

La fédération internationale de laiterie, dans son dictionnaire de terminologie de 1983 définit le lait comme: « Le produit de la sécrétion mammaire normale, obtenu par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ni soustraction » (Didier, 1999).

## II.2. Composition de lait

### II.2.1. L'eau

L'eau est le constituant le plus important du lait (Elfdil, 2016) en proportion représente environ 87 à 88% du poids total du lait. Elle se trouve sous deux formes, l'eau libre (96%) sert de solvant aux éléments hydrophiles du lait et l'eau liée (4%) qui est impliquée dans la structure des micelles de caséines (Siar, 2014).

### II.2.2. Le lactose

La quasi-totalité des glucides est sous forme de lactose, un disaccharide composé de glucose et de galactose, il est le seul glucide libre du lait présent en quantités importantes, sa teneur est très stable entre 48 et 50 g/L (Fredot, 2005).

Le lactose joue un rôle nutritionnel particulier et intervient également comme élément de fermentescibilité (Vilain, 2010).

### II.2.3. Matière grasse

La matière grasse du lait se compose principalement de triglycéride (98%), phospholipides (1%) et d'une fraction insaponifiable (1%) constituée en grande partie de cholestérol et de  $\beta$ -carotène. Elle est constituée de 65% d'acides saturés et de 35% d'acide gras insaturés.

Les matières grasses sont présentes dans le lait sous forme d'une émulsion de globules sphériques dont le diamètre varie de 0,1 à 20  $\mu\text{m}$ , avec une valeur moyenne de 3 à 5  $\mu\text{m}$ . Ces globules gras sont hétérogènes, ils sont essentiellement constitués d'une microgoutte de triglycérides, partiellement cristallisés à température ambiante, entourée d'une fine membrane communément appelée « la membrane du globule gras du lait » ou « milk fat globule membrane » qu' est formée de polypeptides (à raison de 40 %), de triglycérides (à raison de 35 %) et de lipides complexes (phospholipides, stérols, cérébrosides, à raison de 15 % environ) (Danthine *et al.*, 2000).

## **II.2.4. Matières azotés**

La matière azotée du lait est composée en moyenne de 95% d'azote protéique et 5% d'azote non protéique (Valérie, 2002):

### **II.2.4.1. Azote protéiques**

Les protéines du lait, sont les mieux caractérisées de toute les protéines alimentaires, et peuvent être réparties en deux catégories en fonction de pH : les caséines (insolubles à pH 4,6) et les protéines du lactosérum (solubles à pH 4,6) (Siar ,2014).

### **II.2.4.2. Azote non protéique (ANP)**

L'azote non protéique (ANP) comprend principalement de l'urée, mais en proportion très variable : de 20 à 75 %. On y trouve également et par ordre d'importance les acides aminés (10 à 20 % de l'ANP), la créatine (3 à 6 %) l'acide urique (2 à 4 %), l'ammoniaque (1 à 5 %) et la créatinine (environ 1%) (Journet et al., 1975).

## **II.2.5. Autres composants**

### **II.2.5.1. Matière minérale et saline**

Les minéraux du lait représentent une petite fraction (8-9 g/l) du lait comparativement aux autres fractions ; elle contient calcium, magnésium, sodium et potassium.

Ces ions ne sont pas toujours libres en solution mais peuvent être plus ou moins associés entre eux et avec les protéines. Ainsi, selon le type d'ion considéré, il peut être dans la phase aqueuse du lait (cas des ions sodium, potassium et chlorure) ou partiellement complexé avec les molécules de caséines (cas des ions calcium, magnésium, phosphate et citrate) pour contribuer à la structure et à la stabilité des micelles de caséines (Gaucheron et Tanguy, 2009).

### **II.2.5.2. Vitamines**

On distingue d'une part les vitamines hydrosolubles (vitamine du groupe B et vitamine C), et d'autre part les vitamines liposolubles (A, D, E et K) (Jose, 2014).

D'une manière générale, Le lait ne permet pas de satisfaire tous les besoins vitaminiques. Cependant, il existe des laits commercialisés enrichis en vitamines. Ce sont surtout les vitamines A, B1 et B2 qui constituent la valeur nutritive du lait (Huppertz *et al.*, 2006).

### II.3. Généralités sur les caséines

#### II.3.1. Composition et structure chimique

Les caséines représentent 80 % des protéines totales du lait (Marie ,2013) et se définissent généralement comme la fraction protéique qui précipite suivant une acidification du lait à pH 4.6, à une température de 20°C (Guillou *et al.*, 1976) Sont composée de différents fragments :  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\kappa$  (Boulanger *et al.*, 1984).

Les caséines ont un certain nombre de caractères communs, la présence de phosphore sous la forme de groupements phosphoséryls et différents aminoacides, dont les principaux sont la leucine, la proline, l'acide glutamique et une forte proportion de résidus apolaires (Kriou et Kasria, 2015).

Les molécules de caséines sont associées entre elles et à des composants minéraux (calcium et phosphore) sous forme de particules sphériques appelées micelles de caséines (Bellancille, 2011) .Les principales caractéristiques de caséines sont récapitulés dans le tableau 1.

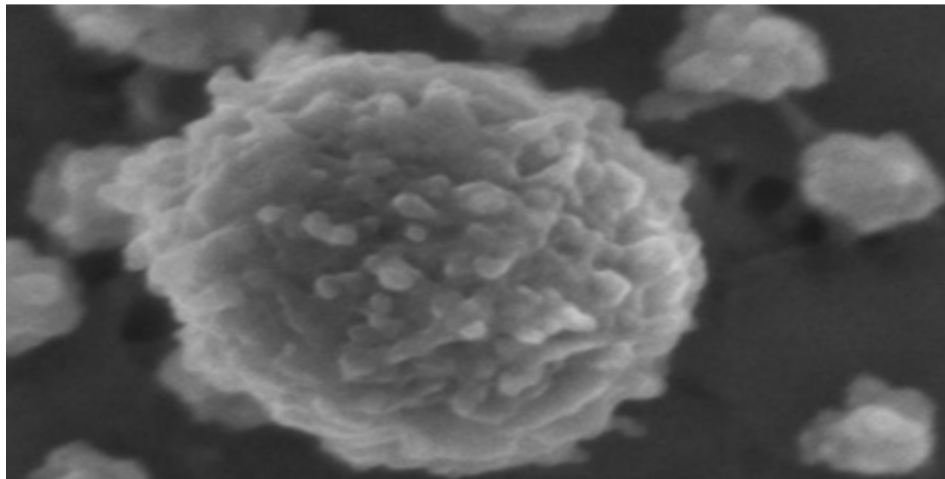
**Tableau 1** : Principales caractéristiques des caséines.

Caséines Caractérisation	$\alpha_{s1}$	$\alpha_{s2}$	$\beta$	$\kappa$
Résidu d'acide aminé/mole	199	207	209	169
Poids moléculaire (dalton)	23600	25200	2400	19000
Résidus cystéine	0	2	0	2
Groupement phosphoséryl	8-9	10-13	4-5	1
Groupement glycolyses	0	0	0	0 à5
Groupement hydrophobes	88	69	111	88
Phi	4,4	-	4,9	3,7

(Leulmi,2016)

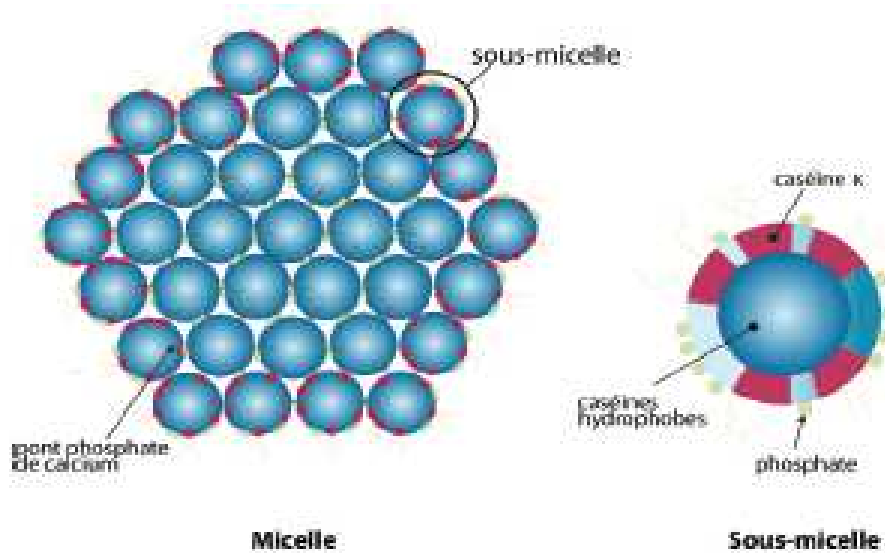
### II.3.2. Micelle de caséine

La micelle de caséine est une particule sphérique d'un diamètre moyen de 50 à 200 nm formée par l'association des caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  et de quelques fragments peptidiques, les caséines  $\gamma$  sont issus de la protéolyse de la caséine  $\beta$  par la plasmine (Benyahia, 2013) et de composants salins dont les deux principaux sont le phosphore et le calcium plus souvent appelés phosphates de calcium colloïdal (CCP) qui assurent en partie la cohésion (Merveille, 2011). Dans la figure 1 on observe une micelle de caséine vue par un microscope électronique qui paraît comme des taches blanches ombrées sphériques ou légèrement ovales.



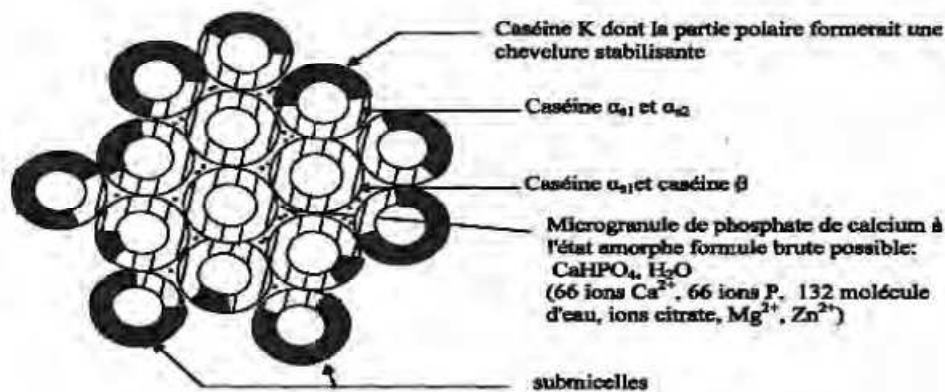
**Figure 1** : Micelle de caséine vue par un microscope électronique (Dalglish *et al.*, 2004).

Les associants qui constituent la micelle, sont appelées des submicelles avec diamètre d'environ 10 nm (Holt *et al.*, 2003). La figure 2 présente un schéma de la structure de la micelle de caséine



**Figure 2:** Représentation schématique de la micelle de caséine (Walstra ,1999).

Les submicelles à faible teneur en caséine  $\kappa$  sont localisées à l'intérieur de la micelle ; celles, riches en caséines  $\kappa$  sont présentes à l'extérieur. La figure 3 montre les submicelles périphériques riches en caséines  $\kappa$  comporteraient des chaînes flexibles. Ces chaînes correspondant aux fragments COOH terminal des caséines  $\kappa$  qui ont un rôle déterminant dans la stabilité des micelles (Benyahia, 2013).



**Figure 3:** Structure d'une micelle de caséine stable (Benyahia, 2013).

Selon Dalgleish *et al.*, 1989 la répartition des caséines s'effectuerait de la façon suivante : la surface des micelles serait composée de 39 à 47% de caséines  $\kappa$ , de 0 à 10% de caséine  $\beta$  et de 47% de caséines  $\alpha$  et l'intérieur serait constitué majoritairement des caséines  $\alpha$  et  $\beta$  avec des proportions d'environ 47% chacune et seulement de 1% de caséines  $\kappa$ .



Dans le lait, il existe plusieurs types d'interactions entre les caséines : les interactions électrostatiques, hydrophobes, les liaisons hydrogène et les ponts disulfures et leur équilibre dépend de différents paramètres tels que le pH, la température et la force ionique (Merveille, 2011).

### III. Fromage

#### III.1. Définition de fromage

Un fromage est un aliment obtenu à partir de lait coagulé ou de produits laitiers, comme la crème, puis d'un égouttage suivi ou non de fermentation et éventuellement d'affinage (Majdi, 2008). Il est le produit affiné ou non de consistance molle, semi-dure, dure ou extra-dure obtenu par coagulation complète ou partielle de lait. Les propriétés du gel formé diffèrent selon la nature de l'agent coagulant et le type de fromage. La coagulation peut être lactique ou enzymatique (Siar, 2014).

#### III.2. Les différents types de fromage

Il existe plus de 350 types de fromages dans le monde à pâte dure ou molle, pressée cuite ou crue, à croûte fleurée ou lavée, on peut regrouper les fromages en 03 catégories :

**Tableau 2 : Les différents types de fromage.**

Type de fromage	Fromage de type lactique	Fromage de type présure	Fromage de type mixte
<b>Caractéristiques</b>	<p>Obtenu essentiellement par coagulation biologique appelé aussi coagulation lactique ou coagulation par acidification.</p> <p>-Ce sont des fromages à pâte fraîche.</p> <p>-Ils sont fabriqués à une température qui va de 16 à 23°C.</p> <p>-Ce type de fromage</p>	<p>-Obtenus essentiellement par coagulation chimique appelé aussi coagulation par l'action des enzymes (la présure).</p> <p>-Ce sont des fromages à pâte pressée, à pâte ferme cuite et à pâte ferme</p>	<p>-Obtenus par Coagulation chimique et par coagulation biologique.</p> <p>-Ils sont obtenus par les deux méthodes de manière équivalente.</p> <p>-Ce sont des fromages à pâte molle.</p> <p>-Ils sont fabriqués à une température de 28 à 37°C.</p>

	demande pour ca fabrication 3 à 10 ml de présure pour 100 l de lait.	non cuite. -ils sont fabriqués à une température qui va de 34 à 40°C. -Ce type de fromage demande pour sa fabrication 25 à 35 ml de présure pour 100L de lait.	-Ce type de fromage demande pour sa fabrication 15 à 25 ml de présure pour 100L de lait.
<b>Exemples</b>	<b>Fromage à pâte fraîche :</b> -Petit suisses -Fromage demi-sel -Chabichou -Mothais sur feuille -Rocamadour -Picodons	<b>Fromage à pâte pressée :</b> -Saint-nectaire -Tome de Savoie -Saint-paulin -Port-salut -Reblochon <b>Fromage à pâte fermenton cuite :</b> -Cantal -Laguiole <b>Fromage à pâte fermecuite :</b> -Comté -Emmenthal -Beaufort	<b>Fromage à pâte molle :</b> -Camembert -Brie -Carré de l'est -Bleu -Roquefort -Munster -Pont-l'évêque -Maroille -Livarot

(Majdi, 2008)

### III.3. La technologie des fromages a pâte molle exemple camembert

#### III.3.1. Définition des fromages à pâte molle

Ce type de fromage «camembert» se divise en trois catégories définis par l'aspect de la croûte et par le procédé de salage: les pâtes molles à croûte fleurie, les pâtes molles à croute

lavée et les fromages à croûte persillée. Ils sont fabriqués à partir de lait pasteurisé ou de lait cru de chèvre, de vache ou de brebis (Emmanuelle, 2006).

### **III.3.1.1. Fromage de pâte molle à croûte fleurie**

L'appellation croûte fleurie vient du duvet de moisissures d'aspect velouté généralement c'est (*penicillium candidum*) et feutré appelée fleur qui se développe pendant l'affinage ce qui leur donne le nom croûte fleurie (Majdi, 2008).

### **III.3.1.2. Fromage de pâte molle à croûte lavée**

Le principe de fabrication d'une pâte molle à croûte lavée est semblable à celui des pâtes molles à croûte fleurie, sauf que le caillé est coupé plus ou moins finement avant d'être mis en moule.

Ce rompage facilite l'écoulement du petit lait : la pâte sera plus serrée, plus compacte mais néanmoins moelleuse, coulante ou plus ferme, selon le degré de séchage. Durant l'affinage, qui s'étend sur deux à quatre mois, le fromage est retourné régulièrement puis brossé ou lavé à l'aide d'une saumure additionné d'hydromel pour but de maintenir l'humidité la souplesse de la pâte et de la croûte et d'éliminer certains ferments (Emmanuelle, 2006 et Majdi, 2008).

### **III.3.1.3. Fromage de pâte molle a croûte persillée ou bleus**

Il s'agit de fromages affinés à pâte légèrement salée, malaxée et d'aspect persillé en raison des moisissures internes de couleur bleue. Les fromages à pâte persillée (bleus) sont des fromages ni cuits, ni pressés, dont le caillé est d'abord réduit en morceaux, moulé, égoutté, salé, puisensemencé de moisissures telles que *Penicillium roqueforti* ou *Penicillium gorgonzola* déposées dans la pâte à l'aide de longues aiguilles.

La fermentation s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur. Tout un réseau de veinures bleu-vert se constitue sous l'action des moisissures, réseau qui se densifie avec le temps. Ces fromages ont un goût poivré, fort et piquant et leur texture est habituellement friable (Magali, 2012).

Généralement le camembert n'est pas prêt à la consommation immédiatement après la fabrication. Il doit être maintenu pendant un certain temps dans des conditions nécessaires

pour que s'opère les changements biochimiques et physiques caractéristiques du fromage (Eck, 2006).

### **III.3.2. Procédé de fabrication des fromages à pâte molle type camembert**

#### **III.3.2.1. La standardisation**

La qualité du lait de fromage peut être définie comme l'aptitude à donner un coagulum permettant d'aboutir dans des conditions normales de travail à un fromage aux caractéristiques physicochimiques définies et avec un rendement satisfaisant.

Le lait présente une grande variabilité dans sa composition et afin de passer de ses variations, l'industriel standardise les différents paramètres (taux de protéine, de matière grasse, la teneur en chlorure de calcium et le pH à des valeurs voulus) (Siar, 2014).

#### **III.3.2.2. La coagulation de lait**

La coagulation est la première étape dans la fabrication des fromages elle résulte d'un changement irréversible du lait de l'état liquide à l'état semi solide appelé gel ou coagulum, il s'agit de l'étape la plus important pour réussir un fromage (Cecchinato et al., 2012). La transformation du lait en fromage comporte quatre étapes principales : la coagulation, l'égouttage, salage et l'affinage. La coagulation correspond à une déstabilisation des micelles de caséines. Elle peut être provoquée par acidification, par l'action d'une enzyme ou par l'action combinée des deux (mixte) (Vignola, 2002, Huppertz *et al.*, 2006).

##### **III.3.2.2.a. Coagulation acide**

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ( $pH_i = 4,6$ ) par acidification biologique à l'aide des ferments lactiques qui fermentent le lactose en acide lactique, ou par acidification chimique par injection de  $CO_2$ , addition de glucono- $\delta$ -lactone ou ajout de protéines sérique à pH acide (Dagleish et Corredig, 2012).

Elle est consécutive à l'abaissement du pH, qui a pour effet de réduire l'ionisation des caséines. Il en résulte une réduction de charge des molécules protéique avec solubilisation de phosphate de calcium micellaire conduisant à la précipitation des caséines à leur pH isoélectrique (Fredot, 2005).

Lors d'une acidification du lait de pH=6,7 à un pH=5, la structure de la micelle de caséine change, sa taille diminue et elle perd sa surface hétérogène, ce qui indique que cette structure est fortement sensible aux variations des constituants minéraux et à la charge de la caséine (Dalglish et Corredig, 2012). En effet à un pH=5,3 la micelle perd la majorité des ions de calcium, de phosphate et du magnésium (Marchin et al., 2007), tout le phosphate inorganique sera perdu lorsqu'on atteint un pH=5,2, quand aux ions de calcium ils seront complètement perdus à un pH=4,6 (Gaucheron et al., 1997).

Le gel obtenu par acidification présente une bonne perméabilité mais une friabilité élevée. Le manque de structuration du réseau a pour conséquence une élasticité et une plasticité pratiquement nulle et une faible résistance aux traitements mécaniques (Vignola, 2002 ; Jeantet et al., 2008).

### **III.3.2.2.b. Coagulation enzymatique**

La coagulation enzymatique du lait est un processus en trois étapes qui sont: la phase primaire ou enzymatique, la phase secondaire et la phase tertiaire comme il le montre la figure suivante (4).

- **La phase primaire (ou enzymatique)**

Cette phase dite enzymatique, correspond à une attaque de l'enzyme sur la caséine  $\kappa$  (composante qui stabilise la micelle) au niveau de la liaison Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>. La chaîne peptidique se trouve ainsi coupée en deux segments, le segment 1-105 est la paracaséine- $\kappa$  et le segment 106-169 qui est le caséinomacropéptide (CMP). La paracaséine- $\kappa$  liée aux caséines  $\alpha$  et  $\beta$  reste intégrée à la micelle hydrophobe et le CMP contenant tous les glucides est libéré dans le lactosérum. Ce qui entraîne une réduction de la charge négative et leurs degrés d'hydratation (Lucey, 2002; Mahaut et al., 2003).

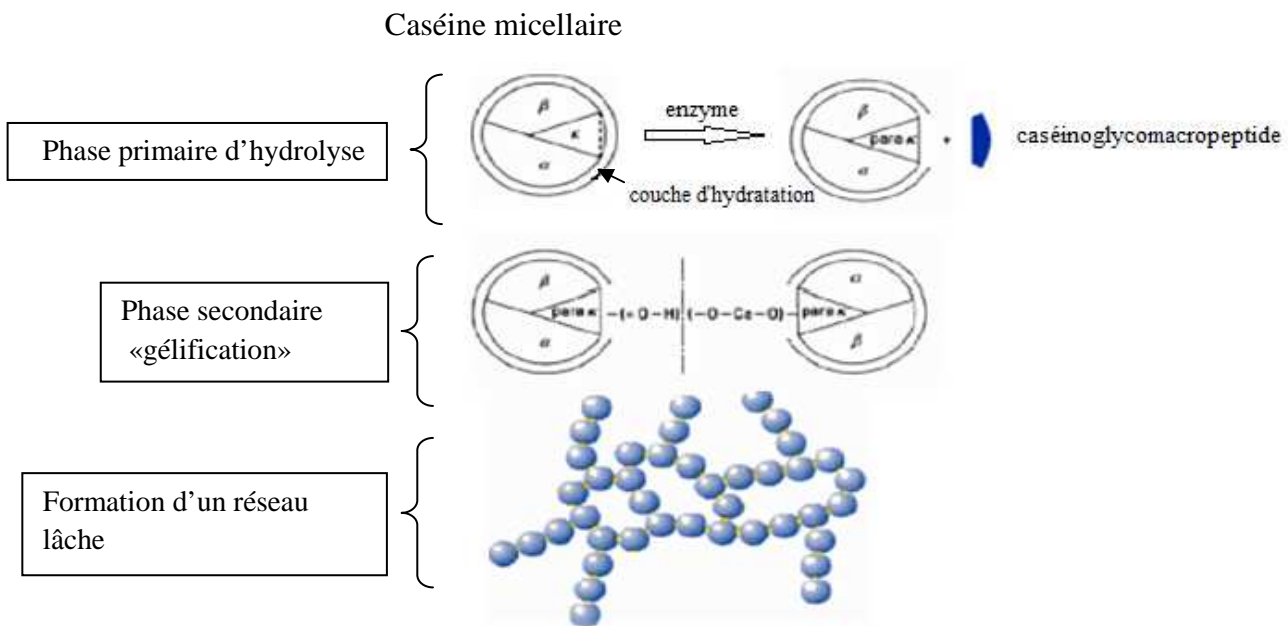
- **La phase secondaire (agrégation des micelles)**

Cette phase commence dès que 85% de la caséine- $\kappa$  est hydrolysée. Elle est dite phase d'agglomération ou d'agrégation ou phase de coagulation proprement dite (Lucey, 2002). Durant laquelle la libération du macropéptide de la caséine- $\kappa$  sous l'action de l'enzyme entraîne la réduction des répulsions électrostatiques entre les micelles de caséines hydrolysées. L'élimination de ces macropéptides entraîne également une réduction du diamètre hydrodynamique et une perte de la stabilité

(Walstra *et al.*, 1981 ; Lucey *et al.*, 2003). La nature des interactions intervenant durant cette phase n'est pas encore bien connue (Vignola, 2002). Toutefois, les ponts calciques et les forces de Van der Waals ainsi que les interactions hydrophobes semblent être impliquées. Les micelles déstabilisées s'agrègent en présence des ions de calcium libres ( $\text{Ca}^{++}$ ) (Dalglish et Holt, 1988). Au début, il ya formation de chaines linaires de micelles qui continuent de s'agréger pour former des amas. Ces derniers constituent le gel protéique qui se sépare nettement de lactosérum (Lucey, 2002).

- **La phase tertiaire (phase de réticulation)**

Durant cette phase, les micelles agrégées subissent une profonde réorganisation par la mise en place de liaisons phosphocalciques et peut être de ponts disulfures entre les para caséines (Mahaut *et al.*, 2002; Vignola, 2002).



**Figure 4:** Phase de la coagulation enzymatique de lait (Vignola, 2002).

### III.3.2.2.c. Coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée d'une enzyme et d'une acidification. La multitude de combinaison conduisant à différents états d'équilibre spécifique est à l'origine de la grande diversité des fromages. (Mahaut *et al.*, 2002).

### **III.3.2.3. L'égouttage**

C'est l'étape qui permet la séparation du lactosérum du caillé. Son but est non seulement de régler la teneur en eau du caillé mais aussi la minéralisation de ce dernier et son délactosage.

Il est possible de distinguer dans cette phase deux actions complémentaires :

- Expulsion du sérum par la synérèse;
- Séparation du sérum et du caillé par action physique.

La pâte obtenue est salée par addition de chlorure de sodium. Le sel inhibe certaines proliférations microbiennes, complète l'égouttage du caillé et relève la saveur du fromage (Abdoune, 2003).

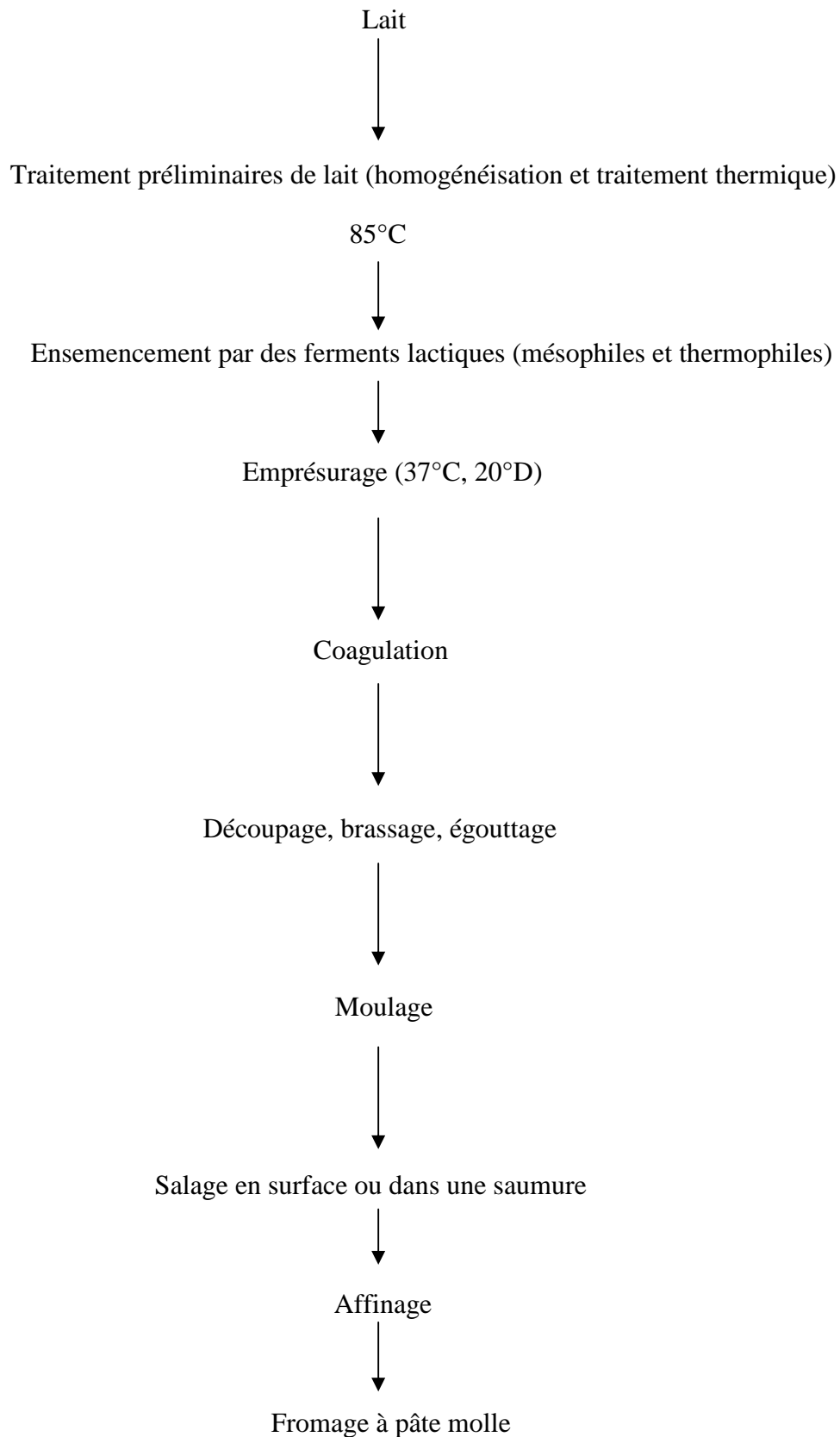
### **III.3.2.4. Salage**

C'est une opération d'enrichissement de la pâte en chlorure de sodium (NaCl) à des doses de 1 à 2%, le salage complète l'égouttage du fromage en favorisant le drainage du lactosérum. Il apporte ainsi le goût caractéristique du fromage et il agit sur l'activité de l'eau qui influence le développement des microorganismes (Eck et al., 2006).

### **III.3.2.5. L'affinage**

Le processus d'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique des composants du caillé. La coagulation et l'égouttage ont assuré la préparation d'un substrat, essentiellement constitué de caséine, de matière grasse et de lactose, en partie converti en lactose. Ce substrat est peuplé de micro-organisme et au cours de l'affinage, ses constituants seront transformés sous l'action d'enzymes présentes à l'origine dans le caillé ou élaborée au cours même de l'affinage par synthèse microbiennes (Choisy et al., 1997).

Les transformations biochimiques confèrent au caillé des caractères nouveaux. La pâte, à l'origine relativement dure, compacte, sans grand saveur est modifiée dans sa composition, sa structure et, par suite, dans son aspect, sa consistance et sa couleur. Simultanément, une saveur et un arôme nouveaux se développent (Vignola, 2002).



**Figure 5:** Diagramme de fabrication des fromages à pâte molle.



## I. Matériels et méthodes

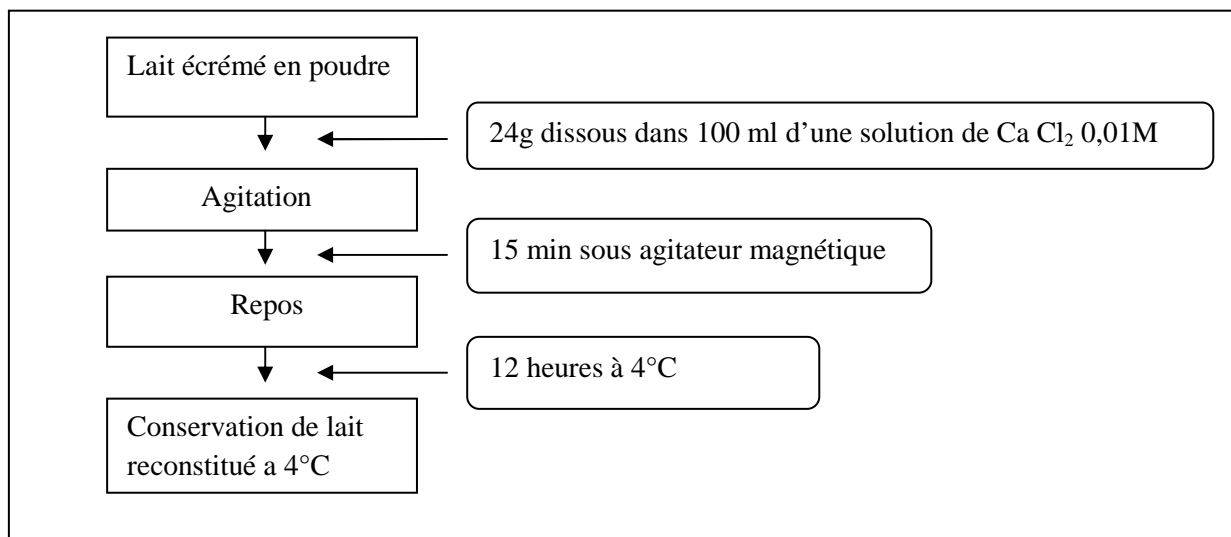
La partie pratique de ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de la nutrition et technologies alimentaires (LNTA) de l'INATAA à Constantine et à la laiterie fromagerie de la vallée à Tazmalt, wilaya de Béjaia. Il consiste en l'extraction d'une protéase d'origine végétale et son usage pour substituer la présure commerciale dans un essai de fabrication d'un fromage type « camembert ».

### I.1. Matières premières

#### I.1.1. Le lait

Le lait utilisé est un lait écrémé en poudre (SOLAREC S.A. Belgique). Cette poudre est importée par l'ONIL-Algérie (Office National Interprofessionnel du Lait).

Le lait est reconstitué par dissolution de 24 g de poudre de lait écrémé dans 200 ml d'une solution de chlorure de calcium ( $[CaCl_2] = 0,01M$ ). L'azide de sodium (0,08%) est ajouté afin de prévenir tout développement microbien. Ensuite la solution est soumise à une agitation lente pendant 30 min à l'aide d'un agitateur magnétique (figure 6), puis stocké à 4°C pendant au moins 12 heures afin de permettre l'équilibre physico-chimique. Le lait ainsi reconstitué est appelé substrat de Berridge ou substrat standard (Benyahia *et al.*, 2013).



**Figure 6:** Préparation de substrat standard (poudre de lait reconstitué).

## I.1.2. La ficine

### I.1.2.1. Récupération du latex

Dans le but de caractériser l'extrait brut coagulant du figuier, la matière première végétale utilisée dans cette étude est le latex qui est le liquide blanc visqueux qui s'échappe des feuilles et des fruits du figuier quand ils sont séparés des tiges ou quand les jeunes tiges sont cassées ce dernier provient des arbres bifères qui appartient à l'espèce *Ficus carica L* cultivés dans la région d'Ahl el kssar et de Takerboust (Wilaya de bouira).

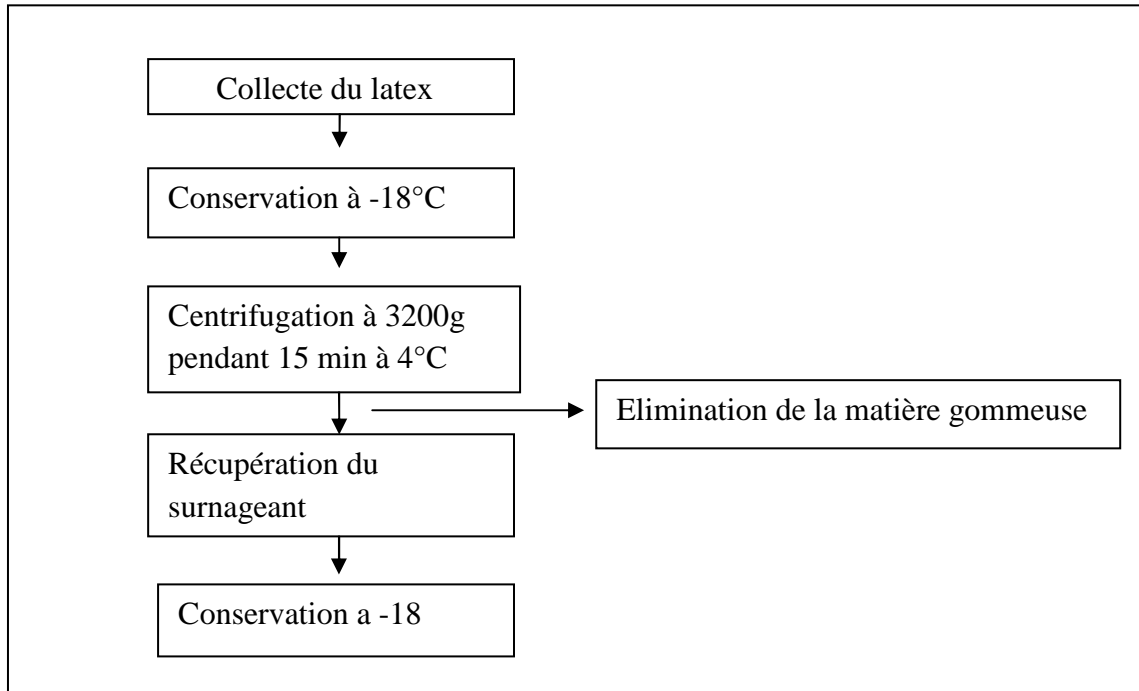
Tous les échantillons ont été collectés durant le mois d'avril 2017, par incision manuelle de pédoncule du fruit vert de la branche principale. Quelques gouttes de latex de la figue immature ont été récoltées en les laissant s'écouler dans des boîtes stériles comme le montre la figure 7 ci-dessous, le latex collecté est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction du système enzymatique.



**Figure 7 :** Collection de latex.

### I.1.2.2. Extraction de la ficine

Le latex est soumis à une centrifugation de 3200 g pendant 15 min à une température de  $4^{\circ}\text{C}$ , afin d'enlever la matière gommeuse précipitée (Rifaat *et al.*, 1970; Mamoru *et al.*, 1974). Le surnageant est récupéré et maintenu à  $-18^{\circ}\text{C}$  jusqu'à son utilisation (figure 8).



**Figure 8 :** Diagramme d'extraction de l'extrait brut de la ficine.

### I.1.3. Caséine

La caséine bovine employée est une caséine commerciale à l'état de poudre, préparée sous forme de caséinate de sodium. Cette poudre est soluble dans l'eau distillée. La solution finale à 50 mg/ml dans l'eau distillée présente un pH de 6,8.

## I.2. Caractérisation physico-chimique de l'extrait enzymatique obtenu

### I.2.1. Mesure de la teneur en matière sèche

Le taux de matière sèche dans les extraits enzymatiques a été déterminé selon la norme AFNOR NF VO4-207 (Anonyme, 1993). Un échantillon de 1 ml de l'extrait enzymatique est placé dans une capsule en verre préalablement taré. Il est ensuite mis à l'étuve à  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'obtention d'une masse constante puis, il est refroidi dans un dessiccateur. Le pourcentage en matière sèche est déterminé par la relation suivante:

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

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

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

$H (\%) = 100 - MS (\%)$  où H : pourcentage en eau (humidité)

### I.2.2. Mesure du pH

Le pH est déterminé directement en utilisant un pH-mètre électronique qui affiche la valeur sur son écran après avoir plongé son électrode dans un bécher contenant la ficine. Cet appareil doit être étalonné avec deux solutions tampons à pH 7 et 4.

### I.2.3. Dosage de la teneur en protéines dans la solution enzymatique

Le dosage des protéines de l'extrait enzymatique est réalisé selon la méthode spectrophotomètre de Lowry *al.*, (1951). Le principe repose sur l'addition successive à une solution protéique diluée à 1% d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu qui donne naissance à une coloration bleu foncée. Cette dernière résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phosphotungstomolybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration protéique contenue dans l'extrait enzymatique et la densité optique relative à la couleur est lue au spectrophotomètre à 750 nm (Noble et Baily, 2009).

#### I.2.3.1. Protocole de dosage des protéines

##### ❖ Solutions nécessaires

**Solution alcaline A :** préparation de solution de  $Na_2 CO_3$  anhydre à 2 % dans Na OH à 0,1 N par la dissolution de 0,2 g de la soude et 1 g de carbonate de sodium  $Na_2 CO_3$  dans 50 ml d'eau distillée.

**Solution cuivrique B :** 2 ml de  $Cu SO_4$  à 0,5 % (0,2g de  $CuSO_4$  dans 40ml d'eau distillé) + 2 ml de tartrate de Na + K à 1 % (0,2 de Na + K dans 20 ml d'eau distillée).

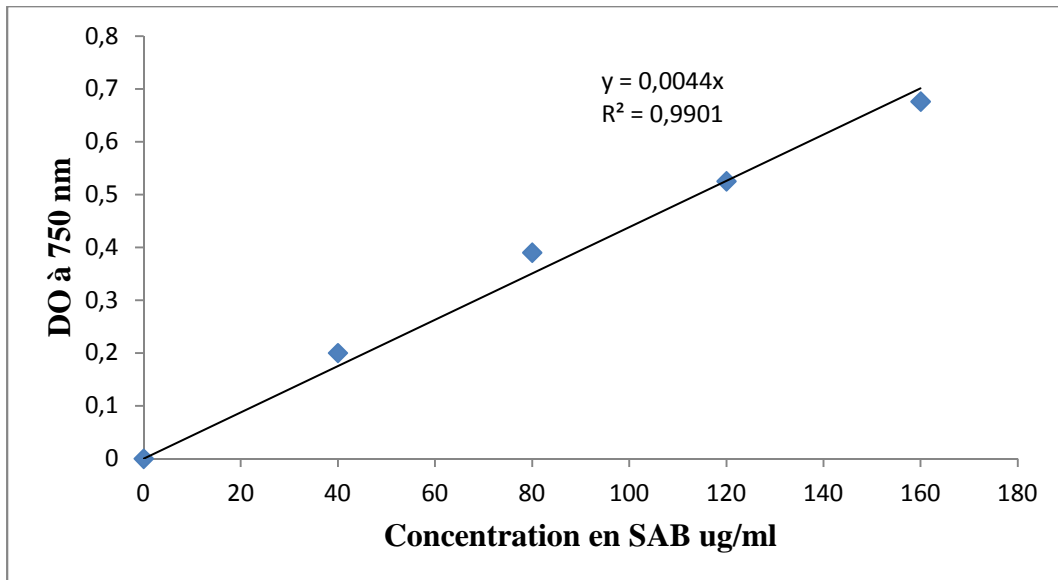
**Solution C:** 50 ml de solution A + 1 ml de solution B.

**Solution D:** réactif de Folin-Ciocalteu commercial dilué à 1/2 dans de l'eau distillée.

### ❖ Mode opératoire

1 ml de la solution réactive (C) est ajouté à 200 µl de l'extrait enzymatique dilué à 1/250. Le mélange est homogénéisé et laissé au repos à l'obscurité et à température ambiante pendant 10 min, 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/2 dans l'eau distillée est ajouté, et homogénéisé. Après une incubation de 30 minutes à l'obscurité, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre (SECOMAM, Prim, France) à 750 nm.

La concentration en protéines est déterminée par extrapolation en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée par des solutions de sérum albumine bovine (SAB) de concentration variant entre 0 et 200 µg/ml (figure 9).



**Figure 9** : Courbe étalon  $DO = f[B.S.A]$  pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al* (1951).

## I.3. Mesure de l'activité enzymatique de la ficine

### I.3.1. Evaluation de l'activité coagulante

L'activité coagulante est déterminée par mesure du temps de floculation selon la méthode de Berridge (1955) (figure 10). Le temps de floculation correspond au temps s'écoulant entre l'addition de l'extrait enzymatique et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne de tube (Benyahia-Krid *et al.*, 2013).

L'unité d'activité coagulante (U.A.C.) ou l'unité présure est définie par la quantité d'enzyme contenue dans 1 ml de la solution enzymatique qui provoque la coagulation de 10 ml de lait en 100 sec à 30°C (Alais, 1974).

L'activité coagulante est calculée selon l'expression suivante :

$$Ac(UP) = (10 \times V)/(T \times V')$$

Où :

V = volume de lait

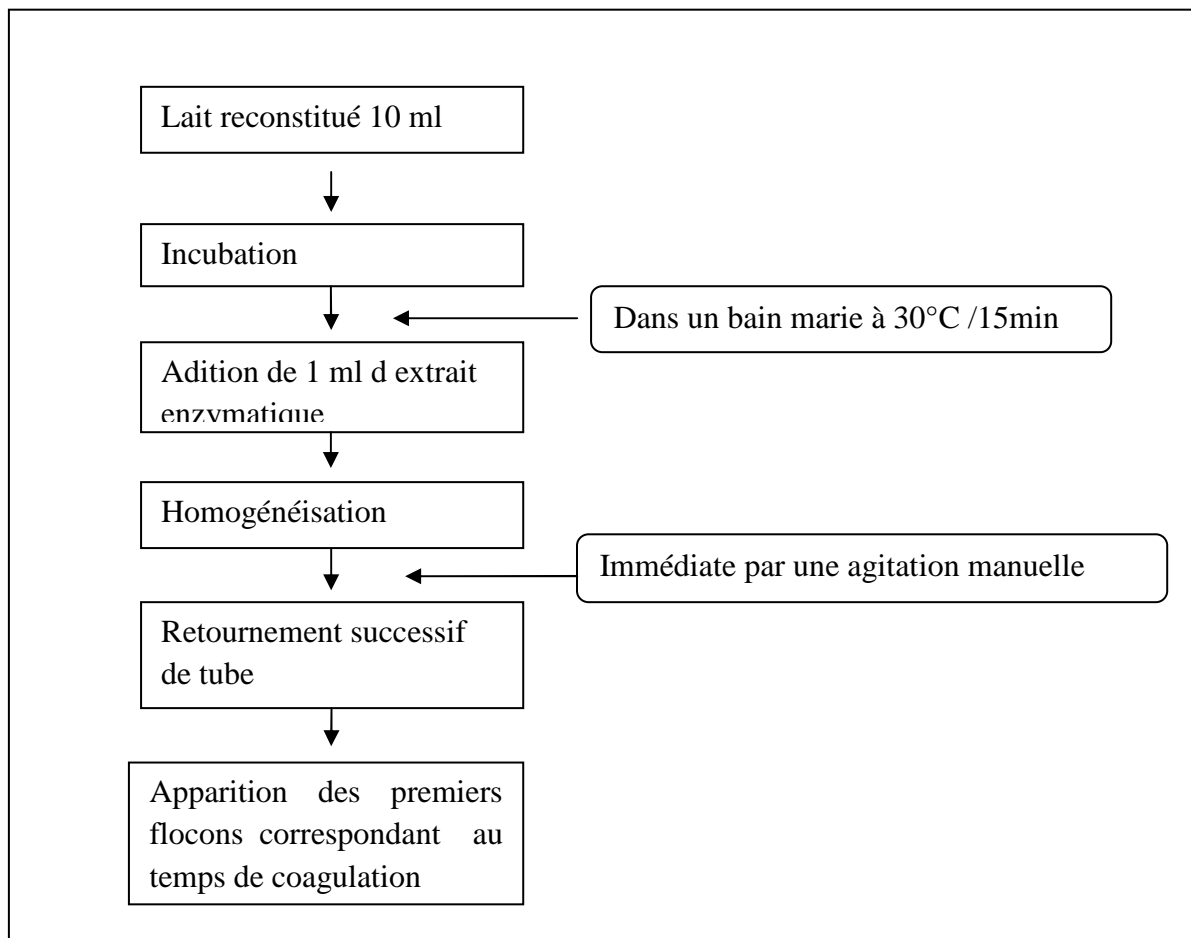
10 = volume du substrat standard (10 ml)

V' = volume de l'extrait d'enzyme

T = temps de floculation en secondes, 100 = temps de coagulation du substrat standard (100 secondes).

Le procédé consiste à répartir 10 ml de substrat standard dans des tubes à essais, suivi d'une incubation dans un bain marie à 30°C pendant 15 min. Un volume de 1 ml de la solution enzymatique est ajouté dans un tube et le chronomètre est déclenché. Le tube immergé est maintenu incliné, de telle sorte que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du lait. Il est régulièrement animé d'un mouvement rotatif autour de son axe. Le lait forme ainsi un film mince et homogène. Le chronomètre est arrêté dès l'apparition des premiers flocons sur la paroi du tube : c'est le temps de floculation.

L'activité coagulante, donnée en UP/ml, est exprimée par la moyenne de trois essais répétés.



**Figure 10 :** Mesure de temps de floculation par la méthode de Brridge (1945).

### I.3.2. La force coagulante

L'activité coagulante est également exprimée par la force coagulante (F). Cette dernière, donnée en unité Soxhlet (US), (Benyahia et al., 2013) et correspond au nombre de volumes de lait coagulable en 40 min (2400sec) par un volume de préparation enzymatique à 35 °C pH 6,4 du substrat (lait).

Elle est calculée selon l'équation suivante:

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

Où :

F : Force de l'enzyme (Soxhlet)

V: volume de lait (pH : 6,4, T° :35°C).

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

T : temps de coagulation en Secondes.

2400 : 40 x 60 secondes.

Nous avons procédé de la même manière que pour la détermination de l'activité coagulante sauf que les tubes sont maintenus pendant 30 minutes à 35°C au bain Marie pour la stabilisation du lait. Le temps de coagulation correspond au temps qui sépare le moment de l'emprésurage (ajout de l'extrait enzymatique) et la formation de gel (coagulation du lait).

### **I.3.3. Détermination de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique de notre extrait enzymatique est mesurée selon la méthode de Green et Stackpole, (1975). Elle permet l'évaluation du taux de dégradation des caséines par l'enzyme pendant la réaction primaire.

Cette activité est déterminée par mesure de la concentration des produits d'hydrolyse de la caséine (tyrosine et d'autres acides aminés) qui sont soluble dans l'acide trichloracétique (TCA) à une concentration finale de 12%.

La réaction enzymatique est stoppée par l'addition du TCA puis une filtration ou centrifugation permet de séparer le précipité de caséine et les produits d'hydrolyse solubles.

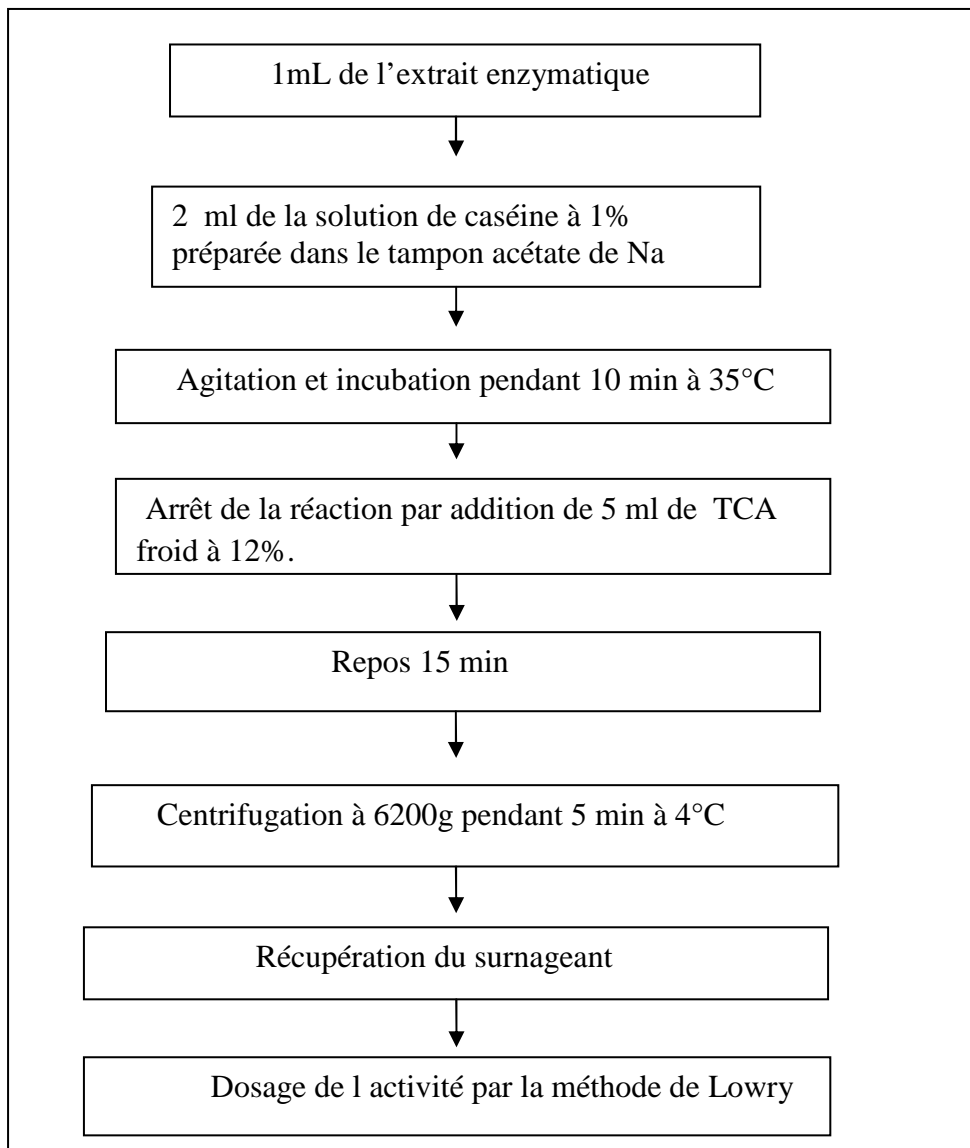
Le dosage des peptides solubles est effectué selon la méthode de Lowry et *al.*, (1951) et les résultats s'expriment en  $\mu\text{g}$  d'équivalent tyrosine par ml d'extrait enzymatique (Federici, 1982), par référence à une courbe d'étalonnage (figure 11) établie à partir des concentrations en tyrosine variant de 10 à 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

#### **➤ Mode opératoire**

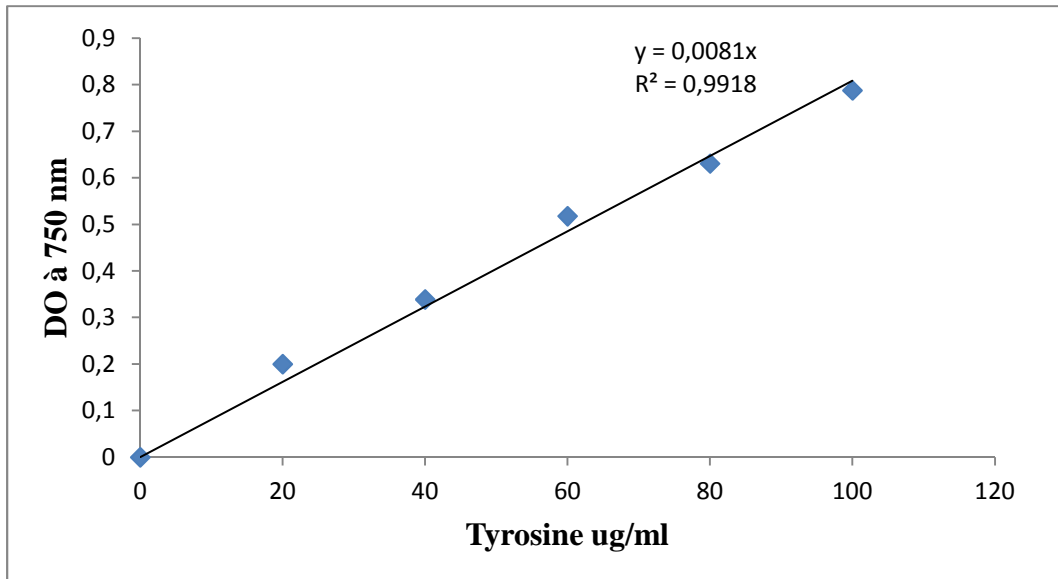
Dans un tube à essai, à 2 ml de la solution de caséine à 1% dans le tampon acétate de Na de pH = 5,2 est additionné de 1ml de l'extrait enzymatique dilué à 1/250. Après une incubation pendant 10 min à 35°C, la réaction enzymatique est stoppée par l'addition de 5 ml de solution trichloracétique (TCA) à 12%, le mélange est laissé se reposer 15 minutes. Les produits d'hydrolyse sont séparés par centrifugation à 6200g pendant 10 minutes, le culot est éliminé



et le surnageant est récupéré pour estimer la quantité des produits d'hydrolyse par la méthode de Lowry (figure 11)



**Figure 11:** Protocole de dosage de l'activité protéolytique.



**Figure 12 :** Courbe d'étalonnage  $DO = f[\text{Tyr}]$  pour l'activité protéolytique.

### I.3.4. Activité spécifique

L'activité spécifique est exprimée par le rapport entre l'activité coagulante de l'extrait enzymatique et le taux de protéines de cet extrait. Ce rapport nous renseigne sur le niveau de pureté de la solution recherchée (Nouani *et al.*, 2009).

## I.4. Détermination des conditions optimales d'activité d'extrait brut de ficine et de la présure microbienne

### I.4.1. Température optimale

L'influence de la température d'incubation du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique est déterminée dans un intervalle de température allant de 40 à 80 °C en fixant la température aux valeurs suivantes : 40 ; 45 ; 50 ; 55 ; 60 ; 65 ; 70, 75 ; 80.

Le temps de floculation est mesuré pour chaque valeur de température par l'ajout de 1 ml de la dilution enzymatique dans un tube contenant 10 ml de substrat de Berridge.

L'activité coagulante est donnée par la moyenne de trois répétitions et tous les essais sont réalisés dans les mêmes conditions de pH et de concentration en  $\text{CaCl}_2$ .

#### **I.4.2. pH optimal**

Le pH a une forte influence sur l'activité enzymatique et par conséquent sur le temps de floculation du lait (Huppertz *et al.*, 2006).

Pour étudier l'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique, le pH a été ajusté pour les valeurs de : 5 ; 5,5 ; 6,0 ; 6,2 ; 6,4 ; 6,6 ; 6,8 ; 7,0 avec des solutions de HCL (0,1N) ou de NaOH (0,1 N) et la concentration en  $\text{CaCl}_2$  est de 0,01M, dans des tubes contenant chacun 10 ml de substrat de Berridge de même préparation et de même température (bain Marie 30 °C). Un volume de 1 ml de la dilution enzymatique est rajouté et le temps de floculation est déterminé

L'activité coagulante est mesurée pour chaque valeur de pH en U.A.C/ml. La valeur de chaque activité coagulante correspond à la moyenne de trois essais.

#### **I.4.3. Concentration du lait en $\text{CaCl}_2$**

Afin de déterminer la concentration en  $\text{CaCl}_2$  qui permet d'obtenir le meilleur temps de floculation, nous avons fait varier les concentrations de lait en  $\text{CaCl}_2$  dans la gamme suivante: 0,005M, 0,01M, 0,02M, 0,03M, 0,04M et 0,05M.

Les tubes contenant 10 ml de solution à tester (solution de Berridge) sont mis dans le bain Marie (30°C) puis 1 ml d'extrait enzymatique est rajouté et le temps de floculation est déterminé (Siar, 2014).

### **I.5. Le processus de la fabrication d'un fromage à pâte molle type « Camembert » à la laiterie de la vallée de Tazmalt**

L'extrait enzymatique étudié c'est la ficine qui a été utilisé comme succédané de présure et ce pour tester la faisabilité de préparation d'un fromage à pâte molle type « Camembert ». Cet essai est réalisé au niveau de SARL laiterie la VALLÉE de Tazmalt wilaya de Bejaia.

#### **I.5.1. La technologie de fabrication de Camembert au niveau de SARL laiterie**

##### **I.5.1.1. La Collecte de lait**

Le lait frais est collecté à partir des citernes réceptionnées conformément à l'exigence de laboratoire de l'unité. Ce lait est stocké est refroidi à 4°C et dans des tanks isothermes avant qu'il soit pasteurisé et transformé en fromage.



**Figure 13:** Tank isotherme.

### **I.5.1.2. Pasteurisation**

C'est un chauffage de lait (85°C pendant 30 secondes) il est modéré et contrôlé pour éviter l'incorporation élevée des protéines sériques et pour réduire le maximum de la charge microbienne. Immédiatement après chauffage, le lait est réfrigéré dans des échangeurs à plaques entre 6°C et 8°C où l'eau chaude est remplacée par de l'eau froide.

### **I.5.1.3. Stockage**

Le lait est stocké dans des tanks à 8°C, pendant 16h afin d'améliorer sa qualité pour l'emprésurage et pour rétablir certains équilibre physico-chimiques par les traitements thermiques.

### **I.5.1.4. L'ensemencement**

C'est l'étape d'enrichissement de lait pasteurisé en calcium par ajout d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  et l'ensemencé par des ferments lactiques et des ferments d'affinage, 80% de la flore mésophiles et 20% de la flore thermophiles, qui vont participer, d'une part, à la coagulation du lait (en provoquant l'acidification), et d'autre part, à l'affinage du fromage (rôle dans

l'activité protéolytique). Le lait doit avoir une acidité de 20°D et une température de travail en cuve de 35°C.

#### **I.5.1.5. La coagulation**

Le lait ainsi enrichi et acidifié est réparti dans des bassines de 50 litres, une quantité de la ficine suffisante pour donner un temps de coagulation d'environ 10 minutes est ajoutée.

Le temps de coagulation est lié directement à la dose de la ficine appliquée et le temps de prise (temps correspondant à l'apparition de petits grumeaux) est entre 5 et 20, donc la coagulation est de trois fois le temps de prise. Ensuite on réalise une coupe franche qui nous permettra de juger la qualité du caillé.

#### **I.5.1.6. Le tranchage**

Le caillé est tranché verticalement et horizontalement par des tranches-caillé à une vitesse la plus faible possible, pour limiter les pertes car le caillé est encore fragile. Cette étape a pour but de former des cubes de 1 cm<sup>3</sup> environ en s'assurant à chaque fois de la libération des surfaces périphériques des récipients et cela pour activer la synérèse (diffusion de lactosérum). Cette opération est suivie d'un repos de 10 à 15 min.



**Figure 14:** Découpage de caillé avec des tranches-caillé.

### **I.5.1.7. Brassage- délactosage**

Deux à trois brassages sont effectués selon le caillé formé, il consiste à mélanger le caillé pour activer la synérèse et permettre au lactosérum de remonter à la surface et au caillé de précipiter, il s'effectue en deux temps, le premier brassage est de 15 à 20 min selon le caillé après un repos de 15 min le 2<sup>em</sup> brassage est réalisé par la suite d'un soutirage qui élimine de 30 à 40 % du volume total de lactosérum avec des pompes spéciales.



**Figure 15 :** Brassage et délactosage de caillé.

### **I.5.1.8. Moulage**

Le lait caillé est mis dans des moules en plastiques sous forme ronde, pour permettre l'égouttage ou la diffusion du lactosérum.



**Figure 16:** Etape de moulage de camembert.

### **I.5.1.9. L'égouttage**

La phase la plus longue, commence au début de moulage et se termine le lendemain matin au démoulage, pendant cette opération on réalise trois retournements pour bien séparer le lactosérum du caillé, après 30 minutes de moulage, nous avons effectué le premier retournement, suivi de deux retournements après 6 et 12 heures de fabrication,

Son but est non seulement de régler la teneur en eau du caillé mais aussi la minéralisation de ce dernier et son délactosage (on mesure l'acidité de sérum qui doit être égale à 16°D).

Selon Bertrand, (1988), il est possible de distinguer dans cette phase deux actions complémentaires :

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

### **I.5.1.10. Démoulage**

Après 24 heures de fabrication on retire le fromage des moules. Il est a signalé que la température de la salle de fabrication (pendant le décaillage, brassage, moulage, l'égouttage et le démoulage doit être constante à 35°C.

### **I.5.1.11. Salage (Saumurage)**

Après le démoulage, le fromage subit un salage par immersion dans un bain de saumure (eau + sel de table 320 g NaCl/1 L d'eau) (figure 17) saturé pendant 1 heure.

Le salage a un triple rôle :

- Il complète l'égouttage et contribue à la formation de la croûte ;
- Il règle l'activité de l'eau ( $A_w$ ) du fromage et par là, freine ou oriente le développement des micro-organismes et les activités enzymatiques au cours de l'affinage ;
- Il relève la saveur du fromage et masque le goût de certaines substances formées au cours de l'affinage ;
- Après saumurage les pièces de camembert sont mises sur des claies inclinées pour éliminer la partie liquide à une température entre 14-17°C.



**Figure 17** : Salage de camembert dans la saumure.

#### I.5.1.12. Affinage

L'affinage est réalisé dans des hâloirs (figure 18), pour favoriser les conditions de l'affinage, la température doit être entre 10 à 12°C, avec 85-95% d'humidité relative). Au niveau de l'unité, le camembert subit un affinage de 12 jours au minimum.



**Figure 18** : Etape de l'affinage de camembert.



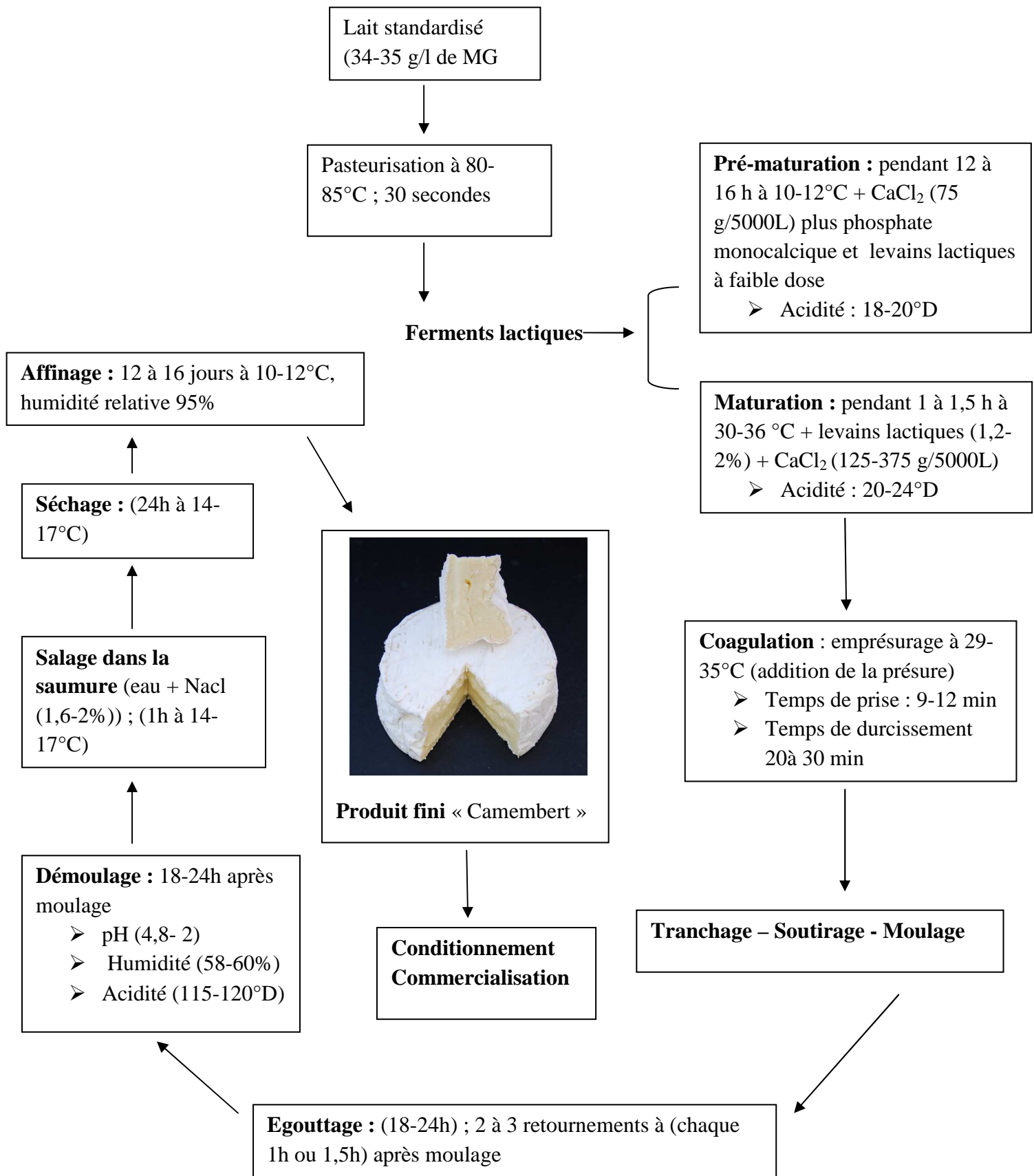
Le 8<sup>ème</sup> jour : on réalise un retournement afin d'assurer une poussé homogène du *pénicillium neige* (fines moisissures blanches) sur toute la surface du camembert et pour permettre l'obtention d'une croûte homogène.

Selon Mietton, (1995), l'affinage est en fait la résultante de trois principales actions biochimiques qui se déroulent simultanément à savoir :

- La dégradation des protéines;
- L'hydrolyse de la matière grasse;
- La fermentation du lactose.

#### **I.5.1.13. Conditionnement**

Se fait au moins après le 15<sup>ème</sup> jour le « Camembert » est conditionné à la laiterie sous forme d'un fromage entier dans un emballage réalisé avec des boîtes en bois, le camembert a besoin de respirer, le bois permet une bonne aération pour l'évolution de l'affinage. Le camembert est prêt à être déguster.



**Figure 19:** Diagramme de fabrication du frommage à pâte molle type « Camembert » à SARL laiterie la Vallée de Tazmalt-Bejaia.

## I.6. Les ferments lactiques et les sels utilisés au cours de la fabrication de camembert

Les ferments ou les levains lactiques sont des cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques (les ferments d'acidification et les ferments d'affinage), qui se multiplient dans le lait et dans les fromages.

❖ Ferments d'acidification :

Mésophiles: - *Flora Danica* et MM

Thermophiles: - STB et TA

❖ Ferments d'affinage : - SAM (souche anti muccor)

-*Geotrichom*

-DH (levure)

-MVA (micrococcoque)

-*Penicillium neige*

Ces ferments assurent deux fonctions essentielles :

- Abaisser le pH du milieu en transformant le lactose en acide lactique.
- Contribuer aux caractères organoleptiques des fromages en libérant les systèmes enzymatiques.

Les sels utilisés sont le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$  à 0,01 M) liquide et le chlorure de sodium (NaCl) solide. En saumure, ce dernier (NaCl) est utilisé à raison de 350g/l pour avoir une densité de 22°D pendant 14 heures.

Le chlorure de calcium est incorporé au lait du fromage après pasteurisation et refroidissement à raison de 0,1 ml/l de lait, il augmente brusquement l'acidité du lait et joue un rôle dans la formation du gel, car celle-ci dépend de la caséine  $\kappa$  et de phosphate de calcium.

## I.7. Prélèvement et préparation des échantillons

Les échantillons de lait et de fromage ayant servi aux différents tests analytiques ont été prélevés à la laiterie de la vallée.

Le lait destiné à la fabrication du fromage est prélevé après le traitement de pasteurisation à 85°C pendant 30 secondes.

Les échantillons de « camembert » ont été prélevés aux stades suivant :

- Après démoulage = (J = 0) ;
- Introduction du fromage aux hâloirs pour l'affinage (stade : J+1) ;
- Après 10 jours d'affinage ;
- Après 12 jours d'affinage ;
- Après 14 jours d'affinage.

### **I.8. Analyse physico-chimiques du lait et de camembert (normes AFNOR, 1980)**

#### ➤ **Détermination de l'acidité titrable**

##### ❖ **Lait**

**Principe :** l'acide lactique présent dans le lait est titré par la soude en présence de la phénolphthaléine.

- **Mode opératoire :** on introduit à l'aide d'une pipette 10 ml du lait à analyser dans un bicher puis on ajoute 3 à 4 gouttes de phénolphthaléine puis on titre avec le NaOH jusqu'au virage de la couleur en rose pâle.
- **Lecture :** la chute de la burette correspond à l'acidité exprimée en °D (degré Dornic).

**Sachant que :** 1°D = 0,01 g/l d'acide lactique.

#### ➤ **Détermination de la teneur en matière grasse (méthode de Gerber. ISO : 3433-2002).**

##### ❖ **Lait**

**Principe :** il est basé sur la dissolution de tous les éléments de l'échantillon sauf la matière grasse par l'acide sulfurique et l'addition de l'alcool iso-amylque, qui favorise la séparation de la MG sous l'action de la force centrifuge.

- **Mode opératoire :** on met dans un butyromètre 10 ml d'acide sulfurique, on ajoute 11 ml du lait à analyser à l'aide d'une pipette puis on ajoute 1 ml de l'alcool iso-amylque, après on met le butyromètre dans la centrifugeuse de 5 à 10 min.
- **Lecture :** se fait sur le butyromètre, la MG est exprimée en pourcentage.

❖ **Camembert**

- **Principe** : cette méthode est basée sur la dissolution de produit à doser (excepté la matière grasse) par l'acide sulfurique. Sous l'influence d'une force centrifuge et grâce à l'adjonction d'une faible quantité d'alcool iso-amylque, la matière grasse. on met dans un butyromètre 10 ml d'acide sulfurique, on ajoute 3 g de camembert à analyser à l'aide d'une pipette puis on ajoute 1 ml de l'alcool iso-amylque, après on met le butyromètre dans la centrifugeuse de 5 à 10 min, après on fait la lecture.

➤ **Détermination de l'extrait sec totale (EST)**

❖ **Lait**

- **Mode opératoire** : sur une feuille d'aluminium qui est porté dans le dessiccateur à 95°C on introduit l'échantillon.
- **Lecture** : la valeur sera affichée sur l'écran de l'appareil

❖ **Camembert**

Le principe consiste à sécher l'échantillon et à contrôler en continu le poids à l'aide d'une balance intégrée. Le pourcentage d'humidité ou de solide est calculé par la différence entre le poids humide initial et le poids sec final.

➤ **Extrait sec dégraissé (ESD)**

L'extrait sec dégraissé est la différence entre l'extrait sec total et la teneur en matière grasse, il est déterminé de la manière suivante :  $ESD = EST - MG$ .

➤ **Détermination de la densité**

• **Lait**

La densité est mesurée à l'aide d'un thermo-lactodensimètre étalonné de manière à donner par simple lecture du trait correspondant au point d'effleurement la densité de l'échantillon de lait à analyser. Selon Mathieu, (1998), dans le cas où la température est différents de 20°C, la densité est ramenée à 20°C par la formule suivante :

- Si la  $T > 20^\circ\text{C}$   $\longrightarrow D = D^\circ + 0,2 (T-20)$  ;
- Si la  $T < 20^\circ\text{C}$   $\longrightarrow D = D^\circ - 0,2 (T -20)$ .

- **Camembert**

La densité est déterminée à l'aide d'un thermo-lactodensimètre étalonné de manière à donner par simple lecture du trait correspondant au point d'affleurement la densité de l'échantillon à analyser dans lequel il flotte.

Deux facteurs déterminent cette densité :

- La concentration des éléments dissous et en suspension ;
  - La proportion de la matière grasse.
- **Détermination de pH** : le pH est déterminé à l'aide d'un pH-mètre pour le lait et le fromage.

## **I.9. Analyses microbiologiques**

Le fromage est le siège d'un développement important des microorganismes. Ces derniers appartiennent à des groupes ou des espèces très diverses et sont originaires de plusieurs sources : le lait, les levains, le sel ou les saumures, le matériel de la fromagerie, l'atmosphère des locaux... (Choisy et al., 1997). La diversité de la flore et son évolution au cours de l'affinage contribuent à la complexité du processus et rendent ainsi son étude très difficile. L'objectif de l'étude de la microbiologie des fromages est d'assurer aux produits une bonne qualité et une bonne conservation et aussi pour garantir la sécurité et l'hygiène des consommateurs.

### **I.9.1. Les germes recherchés dans le lait de vache pasteurisé et dans le camembert**

#### **I.9.1.1. Les *Coliformes* totaux (CT)**

Correspondent à des bacilles Gram négatif, non sporulé, oxydase négatif, aérobie et anaérobie facultatif qui incluent des espèces bactériennes qui vivent dans l'intestin des animaux homéothermes, mais aussi dans l'environnement en général (sols, végétation et eau). (Ceaq, 2009).

#### **I.9.1.2. Les *Coliformes* fécaux (CF)**

Les *Coliformes* fécaux, ou coliformes thermotolérants, sont un sous-groupe des *Coliformes* totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44,5°C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est l'*Escherichia coli* (*E. coli*) et, dans une

moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella* (Edberg *et al.*, 2000).

### **I.9.1.3. *Clostridium* sulfito-réducteur (CSR)**

Les *Clostridium* sulfito-réducteurs sont des bactéries Gram positives, anaérobies, qui forment des spores. Leur habitat naturel est le sol ou le gros intestin de l'homme ou des animaux. La plupart des espèces sont des organismes saprophytes dans le sol. Leurs spores peuvent survivre de longues périodes dans les fèces, le sol, la poussière et l'eau. Leur présence dans l'eau peut être utilisée pour détecter une pollution fécale ancienne ou intermittente. Ils sont capables de réduire les sulfites en sulfures (Rodier, 2005).

### **I.9.1.4. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* est une coccobactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*. Il a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 µm, est immobile, asporulé et facultativement anaérobique. *Staphylococcus aureus* fait partie de la flore humaine et est surtout présent dans le nez et sur la peau. (Murray *et al.*, 2003).

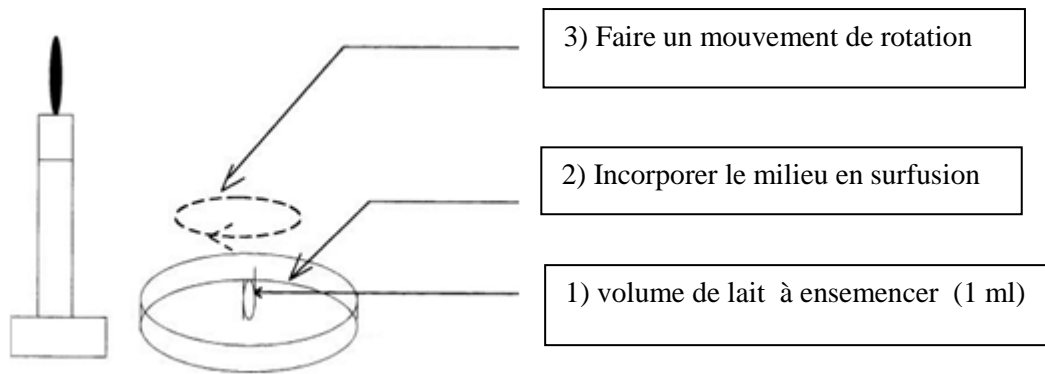
## **I.9.2. Dénombrement des germes recherchés**

### **I.9.2.1. Dénombrement des *Coliformes* totaux (CT)**

#### **➤ Dans le lait pasteurisé**

#### **Le protocole**

- ✓ Ensemencement en double couche de 1 ml de lait sur une boîte petri qui contient la gélose désoxycholate;
- ✓ Incubation à 30°C pendant 24h;
- ✓ Faire le dénombrement des colonies développées à la surface et à l'intérieur du milieu de culture.



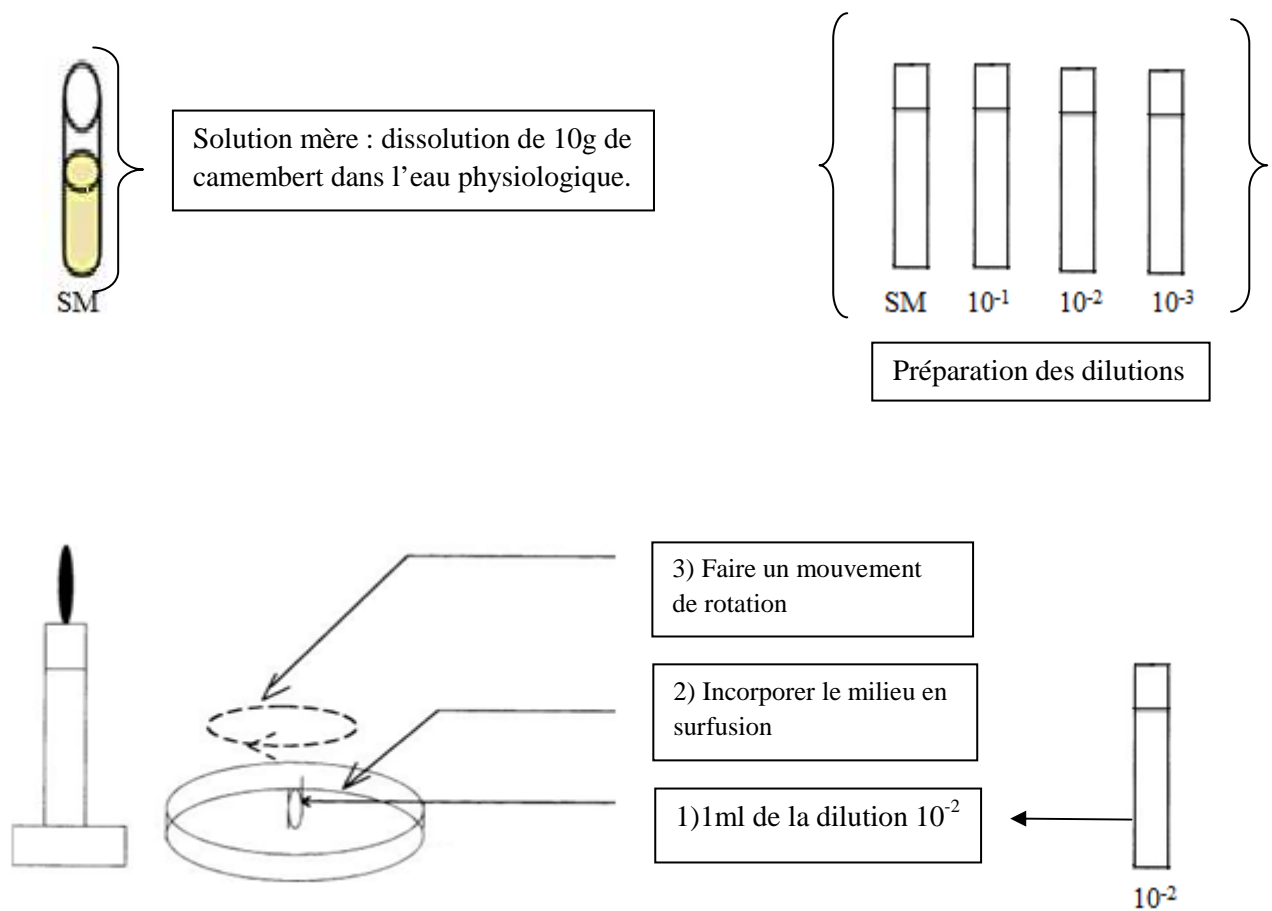
**Figure 20:** Protocole expérimentale pour le dénombrement des CT dans le lait pasteurisé.

➤ **Dans le camembert**

**Le protocole**

- ✓ Préparation de la solution mère (dissolution de 10 g de l'échantillon dans l'eau physiologique) ;
- ✓ Préparation des dilutions décimales à partir de la solution mère ;
- ✓ Ensemencement de 1 ml à partir de la dilution  $10^{-2}$  sur le milieu désoxycholate;
- ✓ Incubation à 30°C pendant 24h;
- ✓ Faire le dénombrement des colonies développées à la surface et à l'intérieur du milieu de culture et multiplier le nombre trouvé par l'inverse de la dilution pour trouver le nombre des germes par millilitre.





**Figure 21:** Protocole expérimentale pour le dénombrement des CT dans le camembert.

### I.9.2.2. Dénombrement des *Coliformes fécaux*

Le protocole expérimentale c'est le même que celui des *Coliformes* totaux, la différence c'est la température d'incubation elle est à 44°C.

### I.9.2.3. Dénombrement des *Staphylococcus aureus*

#### ➤ Dans le lait pasteurisé

- ✓ Ensemencement de lait pasteurisé à l'aide de l'anse de platine sur une boîte pétri qui contient une gélose Chapman;
- ✓ Incubation pendant 24h à 37°C;
- ✓ S'il y aura apparition des colonies dorées on procède au test catalase qui consiste à ajouter quelques gouttes de  $H_2O_2$  sur une lame qui contient une colonie, si le test est positif il y aura une effervescence.

➤ **Dans le camembert**

- ✓ A partir des dilutions décimales on introduit aseptiquement l'anse de platine et on fait des stries sur une boîte pétri qui contient la gélose Chapman;
- ✓ Incubation pendant 24h à 37°C;
- ✓ Dénombrement des colonies développées à la surface et à l'intérieur du milieu de culture et multiplier le nombre trouvé par l'inverse de la dilution pour trouver le nombre de germes par millilitre;
- ✓ S'il y a apparition des colonies dorées on confirme avec le test catalase.

**I.9.2.4. Dénombrement des *Clostridium*s sulfito-réducteurs dans le lait pasteurisé et dans le camembert**

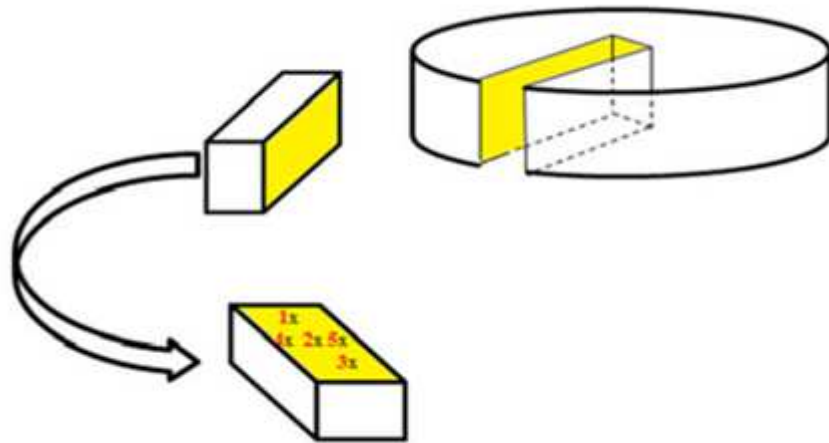
Ensemencer 1 ml du lait dans un tube contenant la gélose viande foie (VF) plus les additifs Alein de fer et Sulfite de sodium, avec quelques gouttes d'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose, incubé à 46°C pendant 72h. Mais pour le camembert l'ensemencement est à partir des dilutions décimales après préparation de la solution mère, puis on dénombre les colonies développées à la surface et à l'intérieur du milieu de culture et multiplier le nombre trouvé par l'inverse de la dilution pour trouvé le nombre des germes par millilitre.

Si le test est positif les *Clostridium*s sulfito-réducteurs apparaissent sous forme des colonies entourés d'un halo noir.

**I.10. Suivi de l'évolution de la texture**

La texture est un aspect primaire pour la qualité des fromages. L'aspect des fromages dans la bouche est apprécié avant leur saveur. La texture peut être évaluée au moyen de techniques instrumentales ou sensorielles, la méthode instrumentale présente l'avantage d'être corrélée à l'analyse sensorielle tout en étant facile à mettre en œuvre (Laitier et *al.*, 2009). Le test de pénétrométrie est effectué sur une tranche coupée perpendiculairement, après que celle-ci soit équilibrée à la température ambiante. Un pénétromètre (PNR10) est utilisé pour cette mesure, il est muni d'un cône qui pénètre en chute libre dans l'échantillon, pendant une durée de 5 secondes, la moyenne de 5 mesures de pénétration en mm, nous donne ainsi une idée sur la fermeté du fromage. La figure 22 montre la méthode de préparation de l'échantillon pour la pénétrométrie. Le test de pénétrométrie donne la distance parcouru par

le cône du pénétromètre dans la masse d'un échantillon sous l'effet de son propre poids, cette distance est en fonction de la dureté du fromage (Fox et al., 2000).



**Figure 22:** Préparation de l'échantillon pour le test de pénétration.

### **I.11. Analyse sensorielle**

Pour mener à terme l'analyse sensorielle du camembert obtenu avec le ferment végétal, nous avons établie une fiche basée sur des questions et une évaluation avec une échelle de 1 à 10 (annexe 2).

## II.1. Caractéristiques physicochimiques du lait utilisé

Pour préparer le Substrat de Berridge à partir de la poudre de lait écrémé (SOLARC.S.A. Belgique) on a dissous 24 g de la poudre de lait écrémé dans 200 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01M.

Les caractéristiques physicochimiques de la poudre de lait écrémé et celle du substrat de BERRIDGE sont présentées dans le tableau 05.

**Tableau 3 :** Caractéristiques physicochimiques de la poudre de lait et du substrat de Berridge.

	Substrat de Berridge	Poudre de lait
EST	11,02	92,70
pH	6,80	/
Acidité (°D)	16,80	/

On a obtenu un pH de 6,8, une acidité évalué à 16,80°D et un extrait sec total (EST) de 11,02% pour le lait reconstitué selon la méthode de Berridge. Ces valeurs sont proches de celles obtenues par différents auteurs Silva et Malcata, (2005) : pH 6,6, acidité titrable à 17°D et EST de 10 à 13%.

## II.2. Caractéristiques de l'extrait enzymatique

L'extraction de la ficine à partir du latex est réalisée par centrifugation (3200 g pendant 15 min à 4°C). Le rendement est d'environ 75% (15 ml de la ficine brute pour 20 ml de latex) avec 25% de matière gommeuse enlevée du latex après la centrifugation.

Ce résultat est proche à celui obtenu par Siar, (2014) estimé à 71,42%. Cette différence peut être expliquée par les différences climatiques entre les régions de collection du latex ainsi que les caractéristiques du sol pouvant influencer sur la composition du latex.

L'extrait enzymatique brut de la ficine obtenu est caractérisé par l'activité coagulante, la force coagulante et l'activité protéolytique (tableau 4).

**Tableau 4:** Caractéristiques de l'extrait brut du latex de *Ficus carica*.

Caractéristiques	Ficine
Rendement (%)	75
pH	5,8±0,1
MS (%)	20±0,01
Taux de protéine (mg/ml)	41,75 ± 0,39
Activité coagulante (UAC) (UP)	103,458 ± 1,69
Force coagulante	21258,911
Activité spécifique UP/mg	2,478
Couleur	Brune claire
Texture	Visqueux

L'extrait de la ficine obtenu est une solution visqueuse de couleur brune claire avec un aspect visqueux. Ces caractéristiques sont confirmées par les résultats de Nouani *et al.*, 2009.

L'extrait obtenu contient 20% en matière sèche, avec 80% d'eau et une teneur en protéine de 41,75±0,39 mg/ml, cette teneur est inférieure à celle rapportée par Siar (2014) évaluée à 89,31± 0,96 mg/ml. Elle est aussi supérieure à celle obtenue par Nouani *et al.*, (2009) estimée à 22 mg/ml.

Notre extrait enzymatique a une activité coagulante de 103,458±1,69 UP. Cette valeur est proche à celle trouvée par Siar (2014), estimé à 121,09 UP. Elle est légèrement inférieure à ceux rapportés par Williams *et al.* (1968) et Leulmi (2016), Lazzouni (2016) qui ont trouvé 188,89 UP, 201.56 UP et 320 U.P respectivement.

La force coagulante s'exprime, par nombre de volumes de lait coagulable par un volume de coagulant, de l'extrait obtenu est de 1/21250,911. En termes de quantité de lait coagulable, 1ml de cet extrait enzymatique peut coaguler environ 21 litres, donc en termes de rendement d'extraction par rapport au volume initial du latex frais 10 ml peuvent coaguler environ 157,5 litres de lait. Cette force est inférieure à celle obtenues par Siar (2014) et Nouani *et al.* (2009) évaluée à 1/42059,76 et 1/40000 respectivement.

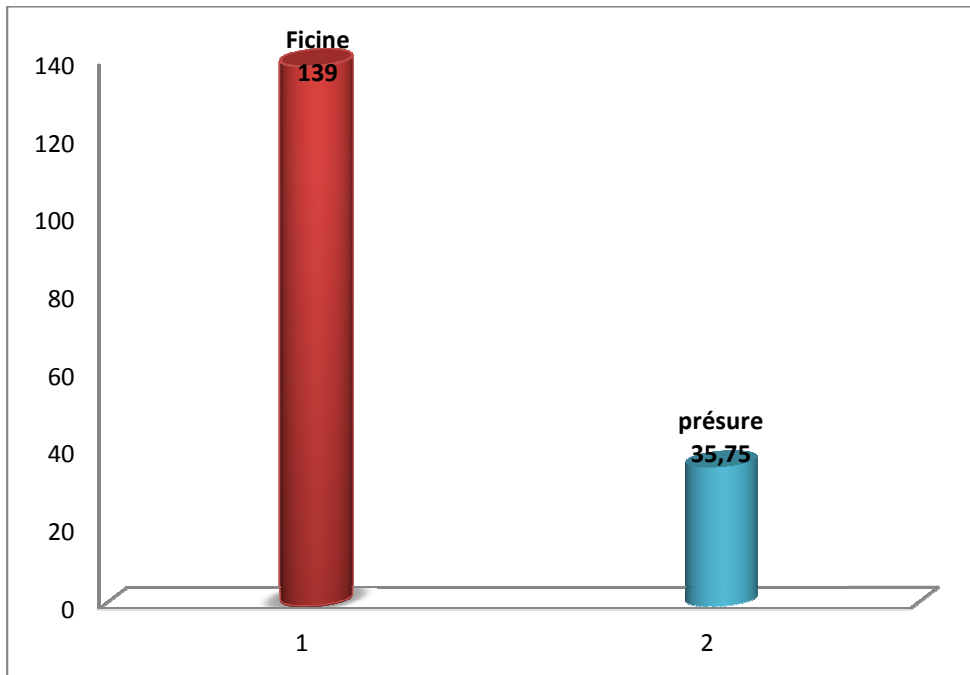
En comparant ces résultats avec ceux des autres enzymes végétales traditionnellement utilisées en fromagerie comme la cardosines, nous constatons que la ficine est dotée d'une activité coagulante, d'une force coagulante et d'un taux en protéines supérieurs à ceux des cardosines obtenus par différents auteurs (Martins *et al.* 1996 ; Nouani *et al.*, 2009).

### II.2.1. Activité protéolytique

Toutes les enzymes coagulantes, sont capables d'hydrolyser la caséine  $\kappa$ , provoquant ainsi la coagulation du lait. Et pour cette condition, ils sont utilisés en industrie fromagère, mais pour la production des fromages de qualité, il faut tenir compte de leur grande activité protéolytique non spécifique supplémentaire qui leur donne le pouvoir d'hydrolyser les caséines  $\alpha$  et  $\beta$  (Vignola, 2002).

Cependant, pour assurer un bon rendement fromager et pour éviter certains défauts de goût et de texture qui peuvent apparaître au niveau des fromages, ces coagulases doivent présenter une faible protéolyse généralement.

La figure 23 montre la quantité des produits d'hydrolyse libérés par notre extrait enzymatique et par la présure.



**Figure 23:** Quantité des produits d'hydrolyse libérés par l'extrait enzymatique étudié et la présure.

Pour cela, nous avons étudié l'activité protéolytique des extraits de ficine et par comparaison à la présure animale en utilisant la méthode de Green *et* Stackpoole (1975). Les résultats ont montré que l'activité protéolytique de l'extrait de ficine est très élevée et elle est 4 fois plus élevée que celle de la présure.

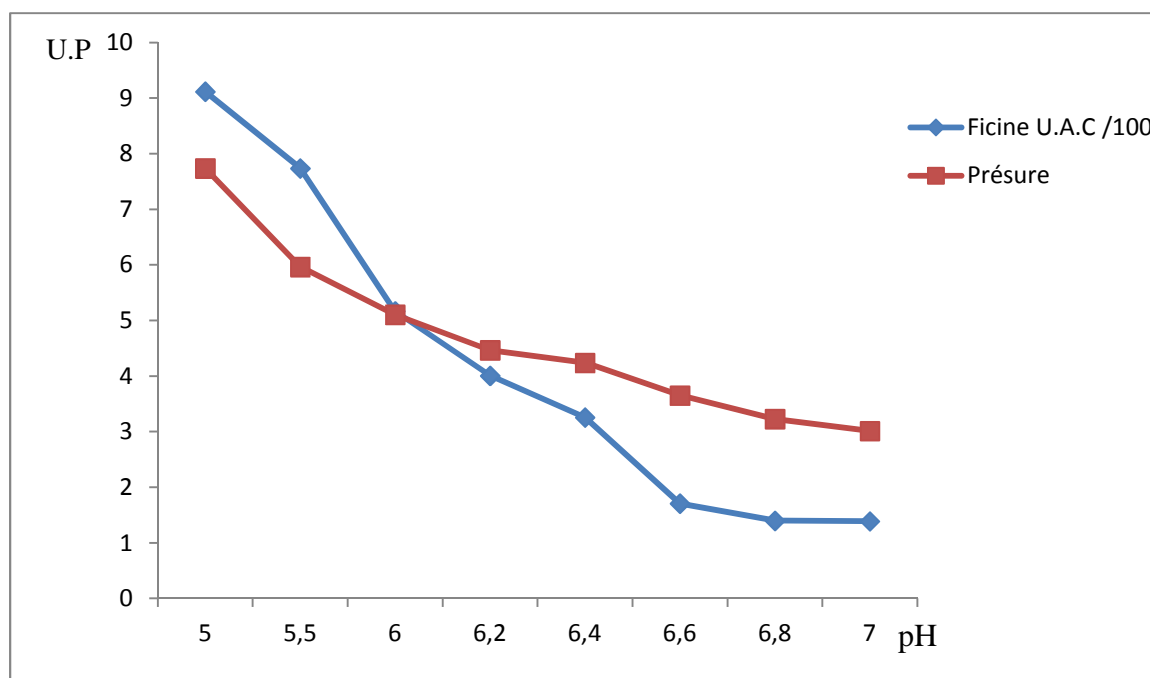
En effet, nous avons obtenu des valeurs de 139,094 µg/ml pour l'extrait de la ficine contre 35,75 µg/ml pour la présure. Cette activité protéolytique excessive de la ficine a été signalée par plusieurs auteurs (Oner et Akar, 1993; Fadyloglu, 2001; Nouani *et al.*, 2009 ; Faccia *et al.*, 2012 et Siar ,2014 ), elle est due à son action non spécifique envers les autres caséines ( $\alpha$  et  $\beta$ ) (Fox et Mcsweeney,1998).

### **II.3. Conditions optimales de coagulation**

La coagulation est influencée par plusieurs facteurs tels que la concentration en enzyme, le pH du lait, la teneur en calcium, la composition en caséines, la dimension des micelles et les traitements préalables du lait (Jeantet *et al.*, 2008). Pour déterminer les conditions physico-chimiques optimales de l'action de l'extrait de ficine et de la présure, nous avons essayé de voir l'influence de certains paramètres sur son activité coagulante par rapport à la présure.

#### **II.3.1. Effet de pH**

L'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait de ficine, a été étudié en ajustant le pH du lait (substrat de Berridge) aux valeurs de l'intervalle 5 à 7. La température d'incubation est fixée à 30 °C. Le pH optimal de coagulation du lait est déterminé par observation du temps de floculation le plus court. La figure 14 donne l'évolution de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique étudié en fonction du pH du lait.



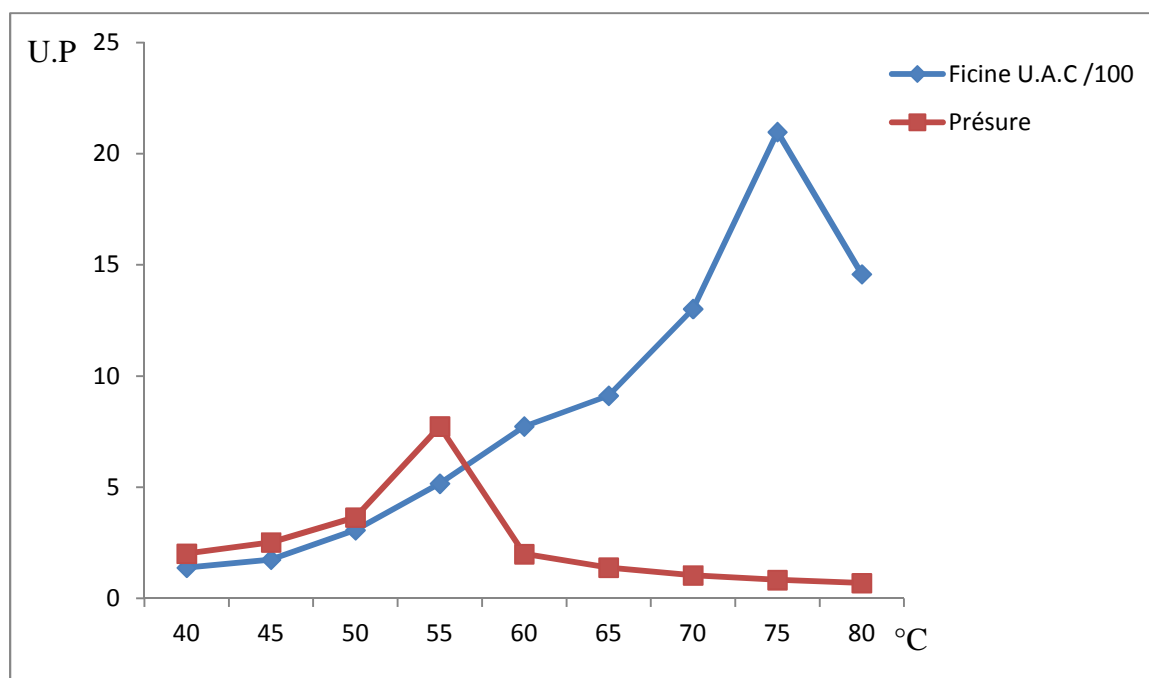
**Figure 24:** Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de la ficine et de la présure.

Les résultats présentés sur la figure 16 montrent une diminution de l'activité coagulante de la ficine et de la présure au fur et à mesure que le pH du lait augmente. En effet, l'optimum d'activité est à pH 5,0 avec une activité coagulante de 911,79 U.A.C Cette activité passe à 516,837 U.A.C à pH 6,0 pour se stabiliser à pH 6,8 avec une activité de 139,86 U.A.C. Ces résultats confirment ceux de Nouani *et al.*, (2009) et Fadyloglu, (2001) qui ont estimé que le pH optimal d'activité pour la ficine est de 5. D'après ces résultats nous constatons que le pH joue un rôle très important dans la coagulation de lait. En effet, l'extrait étudié montre un caractère acide (l'optimum d'activité à pH 5).

### II.3.2. Effet de la température

Pour étudier l'effet de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique étudiée nous avons mesuré l'activité coagulante à différentes températures d'incubation (de 40 à 80 °C). La figure 15 montre l'évolution de l'activité coagulante de la ficine et de la présure.





**Figure 25 :** Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la ficine et de la présure.

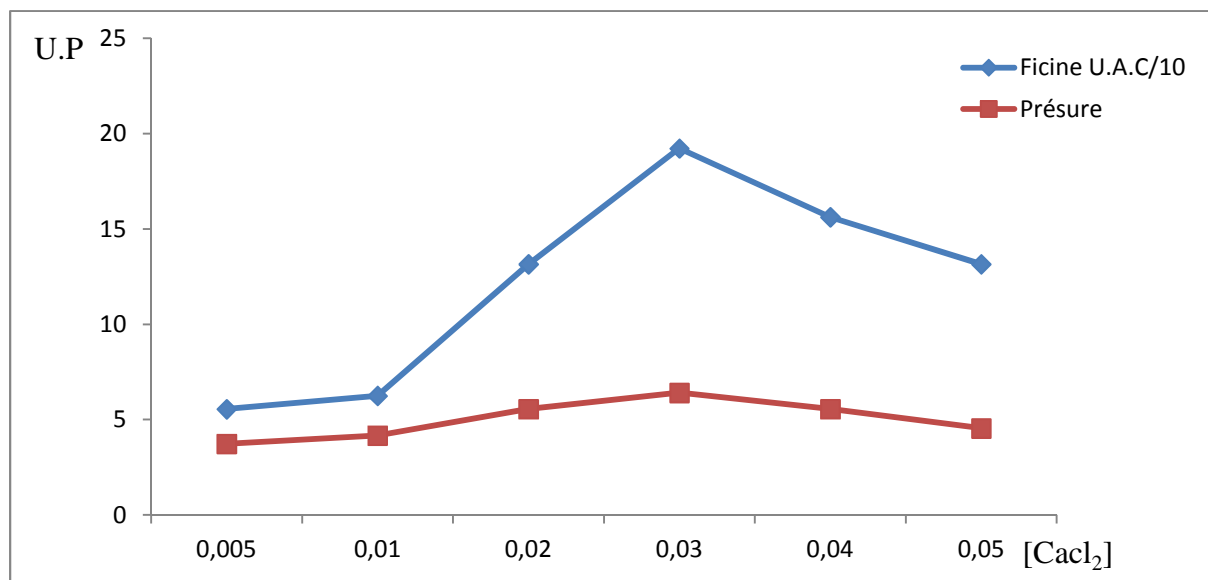
Nous avons remarqué une différence de comportement entre les deux extraits enzymatiques (la ficine et la présure) suivant les températures étudiées. L'optimum d'activité coagulante pour l'extrait de ficine est obtenu à une température du lait égale à 75°C avec une valeur de 2097,90 U.P. Ce résultat est proche de ceux donnés par Nouani *et al.*, (2009) évalué à 80°C, Fadyloglu, (2001) estimé à 60°C et Payne, (2009) qui est de 65°C. Et pour l'optimum d'activité coagulante pour la présure et obtenu à une température du lait égale à 55°C avec une valeur de 773,809 U.P. Ces résultats confirment la grande stabilité thermique de la ficine par rapport à la présure commerciale déclarée par plusieurs auteurs (Grzonka *et al.*, 2007 et Bekhit *et al.*, 2013).

### II.3.3. Effet de la concentration en CaCl<sub>2</sub>

La concentration optimale en CaCl<sub>2</sub> du lait est déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait additionné de quantités de CaCl<sub>2</sub> variant de 0,005 à 0,05 M.

La figure 16 montre l'influence de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante de la ficine et de la présure. D'après ces résultats nous constatons que dans l'intervalle de concentration en CaCl<sub>2</sub> étudié l'activité coagulante augmente avec la concentration en CaCl<sub>2</sub>.

L'optimum d'activité pour la ficine estimé à 192,30 U.A.C est obtenu à une concentration de 0,03 M. Cette concentration est supérieure à celle signalée par Nouani *et al.*, (2009) évaluée à 0,02 M de CaCl<sub>2</sub>.



**Figure 26** : Effet de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante de la ficine et de la présure.

#### II.4. Essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type « Camembert »

##### II.4.1. Caractéristiques physicochimiques du lait utilisé de lait pasteurisé et de lactosérum

###### ❖ Lait

Le lait utilisé pour la fabrication de fromage est collecté dans la wilaya de Bejaia et ses entourages. Le tableau 5 représente la composition physicochimique du lait utilisé.

**Tableau 5** : Composition physicochimique du lait crû utilisé pour la fabrication fromagère.

	Lait crû	Normes AFNOR (1993)
pH	6,4	6,6
Acidité (°D)	16,5	15-18
E.S.T (%)	12	12,3 - 12,5
MG (%)	3	3,2- 3,6
E.S.D (%)	9	8,75 - 9

Densité	1,028	1,027 - 1,032
Test d'iode	Absence d'amidon	/
Test de stabilité	Stable	/

❖ **Lait pasteurisé**

On a fait les analyses physicochimiques de lait crû après pasteurisation.

**Tableau 6 :** composition physicochimique de lait pasteurisé

	Lait pasteurisé	Normes (AFNOR)
pH	6,5	6,60 - 6,70
Acidité (°D)	16,8	16 -18
E.S.T (%)	10	10,2 -12,5
MG (%)	33	34-36
Densité	1,028	1,032 - 1,035

Pour le lait pasteurisé, les résultats des paramètres testés sont dans les normes.

❖ **Le lactosérum au cours de l'égouttage**

**Tableau 7 :** les résultats des analyses physicochimiques du lactosérum au cours de l'égouttage.

Paramètre	Lactosérum	Normes (AFNOR)
pH	6,12	6,12 - 6,15
Acidité (°D)	17	17 -19

Les analyses physicochimiques du lactosérum après moulage et au cours de l'égouttage montrent que le fromage se développe d'une bonne manière.

**II.4.2. Résultats de l'évolution du « camembert » au cours de la phase d'affinage**

**II.4.2.1. Paramètres physicochimiques de « camembert »**

Concernant les paramètres physicochimiques mesurés au cours de l'affinage des fromages, nous constatons que des taux presque similaires concernant le pH, l'acidité, le taux de matière

grasse et l'extrait sec ont été enregistrés aux différents stades de maturation pour les deux essais de fromage :

- (1\*) fromage fabriqué en utilisant la présure commerciale d'origine microbienne.
- (2\*) fromage fabriqué en utilisant l'extrait enzymatique obtenu d'origine végétale.

Pour le pH de fromage fabriqué par la ficine est de 5,08 et le pH de fromage témoin est de 5,12. Nous remarquons que le pH de fromage fabriqué avec la ficine est proche de celui de la présure malgré le changement de l'agent coagulant, d'après ces résultats nous avons confirmé que l'agent coagulant n'influence pas sur le pH de fromage et que celui-ci est influencé par la composition initiale de lait.

Nous remarquons aussi une légère diminution de pH (4,78 pour (1\*) et 4,80 pour (2\*) du début d'affinage jusqu'au stade (J+6) et ce là dans les deux parties (superficielle et interne) des deux types de fromage. Ce phénomène s'explique par la poursuite de la fermentation du lactose résiduel du caillé par les bactéries lactiques.

Après le sixième jour d'affinage, il y a désacidification progressive de la croûte qui permet d'attendre après 21 jours des valeurs de pH équivalentes à 5,19 pour la ficine et 5,26 pour la présure.

Cette augmentation du pH de la croûte, est due au développement des levures et notamment des moisissures (Fox, 1989), qui contribuent à une modification de la texture qui perd son aspect granuleux. Elle induit également une activité maximale de la plupart des enzymes protéolytiques et lipolytiques. A l'opposé, le pH reste acide au niveau interne (pour les deux types de fromage), confirment l'action enzymatiques accrue de la flore superficielle sur l'élévation du pH.

Concernant l'extrait sec total il est varié et influencé selon le type de fromage, la composition initiale du lait, le type de coagulation ainsi que le type d'égouttage.

L'extrait sec total des fromages fabriqués est de 47,49% et 44,88% pour le fromage obtenu avec l'extrait de la ficine et le fromage témoin (présure microbienne) respectivement.

Cette différence dans les valeurs de l'extrait sec total est due principalement aux types des caillés obtenus. En effet, le caillé obtenu avec la ficine donne des petites tranches comparées avec celles obtenues dans les coagulums issus de la coagulation avec la présure microbienne, ce qui rend l'égouttage facile et intensif. Selon Jeantet *et al.*, (2008), le caillé formé avec la présure présente une forte cohésion, élasticité et porosité mais une perméabilité faible, ce qui aboutit à un égouttage spontané limité.

A propos de la matière grasse elle est égale à 27% pour le fromage fabriqué avec la ficine et 24% pour le fromage fabriqué avec la présure.

Ces résultats montrent que les deux essais de fabrication se développent presque de la même manière.

**Tableau 8** : Les paramètres physico-chimiques des fromages obtenus.

Paramètres	Essai par la ficine	Essai par la présure commerciale	Normes
pH	5,08	5,12	5-5,5
EST%	47,49	44,88	44,5-47
MG%	27	24	25-27

## II.5. Analyses microbiologiques

### II.5.1. Résultats des analyses microbiologiques de lait pasteurisé

**Tableau 9** : Résultats d'analyses microbiologiques de lait pasteurisé

Germes recherchés	Lait pasteurisé	Normes des germes Du JO n°35/98
<i>Coliformes totaux</i>	Absence	1
<i>Coliformes fécaux</i>	Absence	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence	1
<i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	Absence	1

Les résultats de contrôle microbiologique effectué sur le lait pasteurisé montrent une absence totale des germes recherchés *Coliformes totaux*, *Coliforme fécaux*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium sulfito-réducteur*.

### II.5.2. Résultats des analyses microbiologiques de camembert

Les résultats du dénombrement des grands groupes microbiens (Tableau 2) montrent que globalement il n'y a pas de différences sensibles dans l'évolution de ces populations pour le cas des deux types de fromages fabriqués, ceci mène à dire que l'extrait de latex de figuier n'influe pas sur la qualité microbiologique du fromage.

**Tableau 10:** Résultats des analyses microbiologiques de fromage issu de la coagulation par la ficine et par la présure commerciale.

Germes recherchés	Fromage issu de la coagulation par la ficine	Fromage issu de la coagulation par la présure commercial	Normes des germes Du JO n°35/98 fromage à pâte molle
<i>Coliforme totaux</i>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
<i>Coliforme fécaux</i>	3	4	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
<i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	Absence	Absence	1

Le contrôle microbiologique effectué sur le produit fini révèle:

- ✓ Une absence totale de *Clostridium sulfito-réducteur* recherché dans les deux cas de fromages fabriqués.
- ✓ On enregistre un nombre qui est dans les normes pour *Staphylococcus aureus*, *Coliforme totaux* et les *Coliformes fécaux* dans les deux types de fromages fabriqués.

## II.6. Test de pénétrométrie

Les résultats de la pénétrométrie sont de 3,6 mm pour le fromage obtenu avec l'extrait de la présure et 2,5 mm pour celui obtenu avec l'extrait de la ficine. Ces derniers représentent la profondeur de pénétration des fromages à la phase finale de l'affinage 17 jours (commercialisés), ce qui signifie un ramollissement de la pâte. Ces résultats sont les mêmes pour les trois répétitions de cinq mesures de pénétration. En effet, le fromage obtenu avec l'extrait de la présure présente une texture nettement plus ferme que les fromages obtenus avec l'extrait de la ficine.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Oner et Akar, (1993), Faccia *et al.*, (2012), qui ont observé le ramollissement des fromage fabriqués avec les extraits de la ficine. Cette perte de dureté est due en major partie à l'activité protéolytique des extraits enzymatiques étudiés.

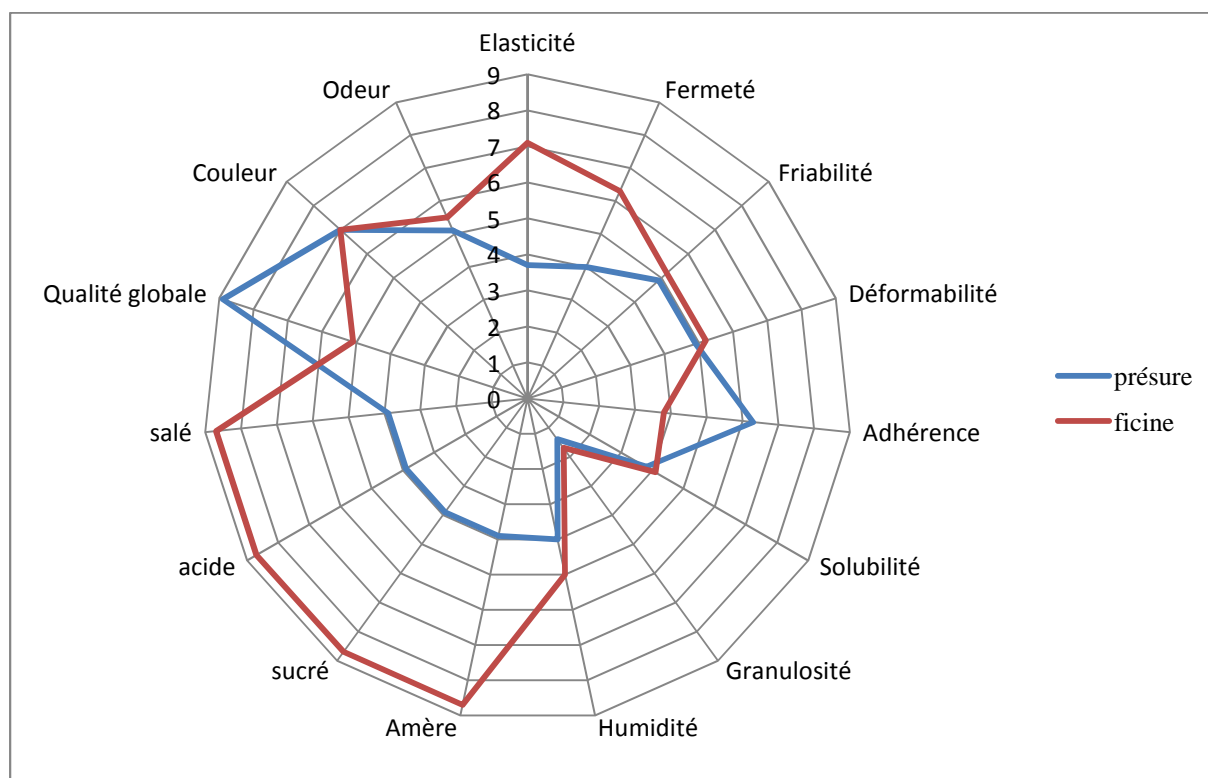
## II.7. Caractéristiques organoleptiques

Pour connaître les caractéristiques organoleptiques de notre camembert à base de la ficine on s'est basé sur une fiche élaborée (annexe 2) afin d'avoir un point de vue objectif sur le ressenti des produit.

L'analyse sensorielle n'a donnée aucune différence entre le fromage obtenu par extrait de la ficine et le fromage témoin obtenu par la présure microbienne pour la plupart des attributs.

Cependant des déférences de goût (légère amertume) et de texture (texture lisse et moelleuse) son perçues dès le 15<sup>ème</sup> jour pour le fromage obtenu avec la ficine.

La figure 27 représente les profils sensoriels parvenus pour les deux fromages (fromage issu de la coagulation par la ficine et fromage témoin).



**Figure 27** : Profil sensoriel des fromages au 15<sup>ème</sup> jour d'affinage.

- **La texture**

Le fromage obtenu avec l'extrait de la ficine est caractérisé par une pâte plus élastique et plus souple par rapport au fromage témoin et une texture lisse et plus ferme. Dès le 15<sup>ème</sup> jour d'affinage la pâte devient un peu molle (Siar, 2014).

Selon Nouani, 2009 ce phénomène est attribué à un développement plus rapide de la texture de la pâte des fromages à base des extraits coagulant végétaux pendant l'affinage, du à une activité protéolytique élevée.

Par contre, le développement de la texture de fromage témoin issu de la coagulation par la présure microbien est trop lent. Selon Claverie et Hernandez, 2007 cette stabilité est du à la faible activité protéolytique de la présure microbienne ainsi qu'à la spécificité de son action sur les caséines.

- **Le goût**

Le goût de fromage obtenu par l'extrait de ficine est acceptable. Il est salé et acide avec un goût émoullent relativement toléré, cependant dès le 15<sup>ème</sup> jour, un léger arrière goût d'amertume a été noté qui se développe avec le temps d'affinage, mais acceptable et même appréciée par certains dégustateurs .Cette caractéristique a été constatée par plusieurs auteurs dans les fromages fabriqués avec la ficine (Fadyloglu, 2001; Oner et Akar, 1993).

Le fromage témoin (issus de la coagulation par la présure microbienne), présente une bonne stabilité de goût. En effet, il est considéré moyennement salé et acide avec absence d'amertume.

- **La couleur et l'odeur**

Pour la couleur et l'odeur, notre analyse à montré qu'il n'existe aucune différence entre les fromages obtenus par l'extrait de ficine et le fromage témoin obtenus par la présure microbienne.

Ces résultats indiquent la possibilité de remplacer la présure par l'extrait de la ficine dans la fabrication des fromages à pâte molle type « camembert ». En effet, les paramètres couleur et odeur et à moindre degré goût et texture répendent aux exigences requises pour ce type de fromage et sont proches de ceux du fromage témoin (présure microbienne).



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

Ce travail visait la caractérisation d'un agent coagulant extrait à partir de latex du figuier *Ficus carica L.* et tester la possibilité de son utilisation dans la fabrication de fromages à pâte molle type «Camembert». Notre démarche a comporté deux étapes. Premièrement la récupération des matières premières renfermant le système enzymatique recherché, l'extraction de la ficine et sa caractérisation de point de vue activité et force coagulante et conditions optimales d'activité (température, pH et [CaCl<sub>2</sub>]), ainsi que l'étude de l'activité protéolytique. En deuxième étape, la réalisation des essais de fabrication industrielle de fromage à pâte molle type «Camembert» au sien de la fromagerie de «LA VALLÉ» en substituant l'agent utilisé par l'industrie (présure microbienne) par l'extrait de la ficine en suivant le même diagramme de fabrication. Aussi voir l'effet de notre extrait sur la qualité organoleptique des fromages, par comparaison à la présure commerciale utilisé par l'unité de production.

L'extraction est réalisée par centrifugation (3200g pendant 15 min à 4°C) et les caractéristiques d'extrait de la ficine sont les suivantes :

- ✓ Le rendement est estimé à 75;
- ✓ Une activité coagulante de 103,458 UP;
- ✓ Une force coagulante de 1/21258,911;
- ✓ Une teneur en protéine de 41,75 mg/ml;
- ✓ Activité protéolytique est de 139 µg d'équivalent tyrosine/ml d'extrait enzymatique estimée 4 fois plus que celle de la présure évaluée à 35,75 µg/ml;

Pour les conditions optimales d'activité a montré une différence de comportement entre l'extrait de la ficine et la présure de référence et les résultats obtenus se résument comme suit :

Le pH optimal de coagulation pour l'extrait de ficine est le même que celui de la présure évalué à 5. Pour la température, nous avons remarqué que l'optimum d'activité pour la ficine est obtenu à une température de 75°C, et la présure à 55°C. Concernant la concentration en chlorure de calcium, l'optimum pour la ficine et la présure est de 0,03 M.

Suite aux essais de fabrication d'un fromage à pâte molle type «Camembert» nous avons constaté que le fromage obtenu en utilisant l'extrait de ficine comme agent coagulant présente une bonne qualité organoleptique avec une texture lisse et molle et une pénétrométrie évaluée à 2,5 mm. L'ordre de préférence des fromages par les dégustateurs est : le fromage à l'extrait de la ficine est le mieux évalué par rapport au fromage a base de présure.

L'apport de cette étude est non négligeable car, les résultats obtenus mettent en évidence la possibilité d'obtention des extraits enzymatiques de sources végétale capables de remplacer la présure dans l'industrie fromagère.

A l'avenir, il serait opportun d'approfondir cette étude par :

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

**Abdoune O (2003).** Qualité du fromage à pâte molle type Camembert fabriqué à la laiterie Draa ben khedda: nature de la matière première et évaluation de l'activité protéolytique au cours de l'affinage et de l'entreposage réfrigéré du fromage. Mémoire de magister en science alimentaire, Constantine, 88p.

**Afnor (1993).** *Contrôle de la qualité des produits alimentaires : lait et produits laitiers : analyses physicochimiques.* Paris La Défense : AFNOR, 4<sup>ème</sup> éd, 581p.

**Afnor F (1980).** Détermination de la matière sèche (méthode par étuvage). NFV04282, Recueil de normes françaises. Lait et produit laitiers. Méthodes d'analyse, Afnor, paris, France 104-105.

**Anonyme (1993).** Recueil de normes françaises AFNOR-DGCCRF. Contrôle de la qualité des produits alimentaires. Lait et produits laitiers, Analyse physicochimiques, 4<sup>ème</sup> édition, 561p.

**Agrawal A, Konno K (2009).** Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 40: 311-331.

**Alais C (1974).** Principes des techniques laitières : science du lait. Ed : Publicité, Paris. 513p.

**Azarkan M, Matagn A, Wattiez R, Bolle L, Vandenameele J, Baeyens Volant D (2011).** Selective and reversible thiol-pegylation, and effective approach for purification, and characterization of five fully active ficin (iso) forms from *Ficus carica* latex. *Phytochemistry*, 72:1718-1731.

**Banga H, Godeau J, El Amiri B, Drion V, Perenyi Z, Sousa N, Beckers J (2002).** Evaluation de l'utilisation du pepsinogène sanguin comme bio marqueur de l'intégrité de la muqueuse gastrique chez le porc, 146:339-346.

**Bekhit A, Hopkins D, Geesink G, Bekhit A, Philip F (2013).** Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 89p.

**Bellancille M (2011).** *Conditions de production et biodiversité bactérienne des produits laitiers fermentés artisanaux du Sénégal.* Thèse doctorat unique en biologie appliquée et modélisation des systèmes biologiques, l'université polytechnique, bobo-dioulasso, 178p.

**Benedicte N (2012).** Le lait : produits, composition et consommation en France .*Cahiers de nutrition et de diététique*, 47:242-249.

**Benyahia F (2013).** *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.* Thèse doctorat en sciences alimentaires, université Constantine 1, 173p.

**Benyahia A, Attia H, Zidoune M (2013).** Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: Interactions and microstructure. *Journal of Agriculture, Biotechnology and Ecology*, 3:75-86.

**Berridge J (1955).** *Purification and assay of rennin. Methods in enzymology.* Perlmann G.E. and Loran Academy, New York, 2:69-77.

**Bertrand F (1988).** Le fromage grand œuvre des microbes. *Revue générale de froid*, 78:519-527.

**Boughellout H (2007).** Coagulation du lait par la pepsine de poulet. Thèse de magister. INATAA Université Mentouri de Constantine, 93p.

**Carole L, vignola (2002).** Fabrication de fromage *in* : science et technologie du lait. Presses internationales polytechnique [En ligne] consulté le [20-03-2017]. Disponible sur: [<http://maitrise-de-la-technologie-fromagere-et-contrôle-qualité-des-fromages-aoc.html>]. p123-140.

**Cearq (2009).** Recherche et dénombrement simultané des coliformes fécaux et *d'Escherichia coli* dans l'eau potable avec le milieu de culture. Centre d'expertise en analyse environnementale, Gouvernement du Québec, 20p.

**Cecchinato A, Penasa M, Cipolat C, Demarchin M, Bittante G (2012).** Short communication: Factors affecting coagulation properties of Mediterranean buffalo milk journal dairy Science, 95:1709-1713.

**Choisy C, Desmazeaud M, Gripon J, Lambret G, Lenoir J (1997).** La biochimie de l'affinage. *In: le fromage*, Tec & Doc Lavoisier, Paris, p450.

**Claverie F, Hernández C (2007).** Aspartic Proteases Used In Cheese Making *In* Polaina Maccabe, *Industrial Enzymes*, p207-219.

**Collin J (2015).** *Présures et coagulants de substitution: Comment faire le bon choix?*. Editions Quae, p60-80.

**Dalgleish G, Home D, Law A (1989).** Size-related differences in bovine casein micelles. *Biocchimica et Biophysica*, 991:383-387.

**Dalgleish D, Holt C (1988).** A geometrical model to describe the initial aggregation of partly renneted caseinmicelles. *Journal of colloid and interface science*, 123, N° 1.

**Dalgleish G, Spagnuolo P, Goff H (2004).** A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 14:1025-1031.

**Dalgleish D, Corredig M (2012).** The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Food Science Technology*, 3:449-467.

**Danthine S, Blecker C, Paquot M, Ninnocente N, Deroanne C (2000).** Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait : synthèse bibliographique. *Lait*, 80:209-222.

**Devaraj K, Kumar P, Prakash V (2008).** Purification, characterization and solvent induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *Journal of Agricultural food*, 23:11417-11423.

**Devaraj K, Parigi R, Prakash V (2011).** Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. *Process Biochemistry*, 46:458-464.

**Dicko M (2016).** Cours Enzymo Licence Générale, 2016. Université d'Ouagadougou. [En ligne] consulté le [13-06-2017]. Disponible sur: [<http://works.bepress.com/dicko/51>], p69- 85.

**Didier L (1999).** Le colostrum, un lait particulièrement riche en de nombreux composants : peut-on en déceler la présence dans les livraisons de lait de vache ?. 79:465-488.

**Eck A, Gillis J (2006).** Le fromage. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, 3<sup>ème</sup> édition, Paris, p874.

**Edberg S, Rice E, Karlin R, Allen M (2000).** *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for publichealth protection. *Journal of applied microbiology*, 88:106-116.

**Elfedil M (2016).** *Contribution à l'étude de l'hydrolyse enzymatique de la caséine de lait écrémé pour des fins industrielles*. Master en agronomie, abou baker belkaid, Tlemcen, 39p.

**Emmanuelle R (2006).** *Sécurité sanitaire liée à la consommation de fromage*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Nantes. p27-31.

**Faccia m, Picariello G, Trani A, Loizzo P, Gambacorta G, Lamacchia C, Di Luccia A (2012).** Proteolysis of Cacioricotta cheese made from goat milk coagulated with caprifiig (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *European Food Research and Technology*, 234:527-533.

**Fadyloglu S (2001).** Immobilization and characterization of ficin. *Nahrung/Food* 45 N°2, p143-146.

**Federici F (1982).** Comparative study of some properties of new milk: coagulating enzyme and tow commercial rennet. Symposium international sur l'utilisation des enzymes en technologie alimentaire. Versailles.

**Feijoo S, Lucia, Blasco, Lucia, Luis R, Jose (2014).** Recent patents on microbial proteases for the dairy industry, n°1, 8:44-55.

**Fox P, Mcsweeney P (1998).** Dairy Chemistry and Biochemistry. UK: Blackie Académie and Professions!.

**Fox P (1989).** The milk protein system in developpements in dairy chemistry; functional milk proteins. Elsevier science puplishers, p1-53.

**Fredot E (2005).** *Connaissance des aliments.* Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, *Lavoisier*, Paris, 424 p.

**Gaucheron F, Famelart M, Mariette F, Raulot K, Michel F, Legraet Y (1997).** Combined effects of température and hight pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. *Food Chemistry*, 95:439-447.

**Gaucheron F, Tanguy G (2009).** Modifications de la qualité biochimique des laits et des produits laitiers par la technologie. *Science et technologie du lait et de l'œuf*, 4:131-134.

**Gonzalez N, Badillo A, Aranda S, Oliver C (2011).** Production of plant proteases in vivo and *in vitro* a review. *Biotechnol*, 29:983-996.

**Goussen H, Leroy JF, et Ozenda P (1982).** Précis de botanique, tome II : végétaux supérieure. Masson, p 558-560.

**Green M.L, et Stackpoole A (1975).** The preparation and assessment of a suitable *MucorpuillusLindt* proteinase, swine Pepsin mixture for cheddar cheese – making. *Journal of dairy research.* p297-312.

**Grzonka Z, Kasprzykowski F, Wiczek W (2007).** Cysteine proteases. Chapter 11. *J. Polaina and A.P. Maccabe (eds.), Industrial Enzymes*, p181-195.

**Guillou H, Pelissier J, Grappin R (1976).** Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *le lait*, 66:143-175.

**Hadj Abderrahmane H (2014).** *Recherche des substances à activité antimicrobiennes produites par des souches bactériennes isolées à partir du lait bovin.* master académique Microbiologie fondamentale et appliquée, université kasdi merbah ,Ouargla, 55p.

**Harmana L (2008).** *Etude comparative de deux proteases coagulant le lait extraite de poulet (Gallus gallus) et d estomac de limon (Seriola sp).* Mémoire magistère en science agronomique, institut nationale al Harrach, Alger, 77p.

**Holt C, Kruif G, Tuinier R, Timmins A (2003).** Substructure of bovine casein micelles by Small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 213:275-284.

**Huppertz T, Upadhyay V, Kelly A, Tamime A (2006).** Constituents and Properties of Milk from Different Species. *Brined Cheeses*. Edited by Dr Adnan Tamime. Copyright © 2006 by Blackwell Publishing Ltd. p1-34.

**ISO 3433 (2002).** Fromages -Détermination de la teneur en matière Grasse- Méthode acidobutyrométrique, International Organization of Standardization.

**Jeantet R, CroguenneC T, Mahaut M, Schuck P, Brule G (2008).** Les produits laitiers. Ed.Tec& Doc, Lavoisier, 185p.

**Joseph J, Raj J (2011).** Pharmacognostic and phytochemical properties of Ficus carica. *International Journal of Pharm Tech Research*. p8-12.

**Jose R (2014).** *A propos du lait cru.* Lait et produit laitières, Diversi FERM ,68 p.

**Journet M, Verite R, Vignon B (1975).** L'azote non protéique du lait : facteurs de variation. *Le lait*, 55:212-223.



**Julio Poliana, et Andrew P Maccabe (2007).** *In: Industriel enzyme: Structure, Fonction and Application.* Springer, 2007, p185.

**Katsaros G, Katapodis P, Taoukis P (2009).** High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain. *Journal of Food Engineering*, 91:42-48.

**Kim Y, Park S, Lee E, Cerbo R, Lee S, Ryu C (2008).** Antibacterial compounds from rose bengal-sensitized photooxidation of *b caryophyllene*. *Journal of Food Science*, 73:540-545.

**Krio K (2015).** *Influence de la température de stockage sur la qualité du lait de vache (lait entier, partiellement écrémé et écrémé) pasteurisé conditionné et le lait reconstitué conditionné*, master en sciences et techniques des productions animales université Djilali bounaama , khmis Miliana, 82p.

**Laitier C, Chatelin Y, Doutari E, Barrucand P, Duchesne C, Morge S, Barral J, Cuvillier D, Minard L, Leroux V (2009).** Evaluation et maîtrise de la texture des fromages frais de chèvre à coagulation lactique. *Rencontre Recherche Ruminants*, 16:143-146.

**Lansky E, Paavilainen H, Pawlus A, Newman R (2008).** *Ficus spp.* Ethno botany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 119:195-213.

**Lazzouni I (2016).** *Hydrolyse des caséines bovines par des protéases végétales en vue de réduire leur allergénicité.* Magister en sciences alimentaires, Université des Frères Mentouri, Constantine, 101p.

**Leulmi I (2016).** *Hydrolyse enzymatique des caséines bovines par la ficine et les cardosines en vue d'obtenir des peptides antimicrobiens.* Mémoire de Magister. Sciences alimentaires. Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro-alimentaire Université de Constantine, p18-20.

**Libouga D, Vercaigne-marko D, Djangal S, Choukambou E, Beka R, Aboubakar T, Guillochon D (2006).** Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *balanites aegyptiaca*. *tropicultura*, 24:229-238.

- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951).** Protéine measurement with the folin phénol reagent. *Dairy science*, 193: 265-275
- Lucey J (2002).** Rennet coagulation of milk *in* Roginski H., Fuquay J. Fox P. *Encyclopedia of Dairy Science*. Elsevier, p286-293.
- Lucey J, Johnson M, Horne D (2003).** Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *J. Dairy Science*, 86:2725-2743.
- Magali P (2012).** *In* : La transformation fromagère caprine fermière. Tec & Doc, Lavoisier, p85-87.
- Mahaut M, Jeantet R, Brule G (2003).** Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc Lavoisier. p194.
- Majdi A (2008).** Maitrise de la technologie et contrôle qualité des fromages AOC Institut national agronomique de Tunisie [en ligne]. Disponible sur <[http:// Maitrise-de-la-technologie-fromagere-et-contrôle-qualité-des-fromages-AOC.html](http://Maitrise-de-la-technologie-fromagere-et-contrôle-qualité-des-fromages-AOC.html)>. (Consulté le 22-03-2017). p21-24.
- Mamoru S, Masanor S (1974).** Studies on proteinases from *Ficus carica* (purification and properties of a sugar-containing proteinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 350:38-47.
- Marchin S, Putaux J, Pignon F, Leonil J (2007).** Effects of the Environmental Factors on the Casein Micelle Structure Studies by Cryo Transmission Electron Microscopy and Small-angle X- ray Scattering/Ultrasmall- angleX-ray Scattering. *Journal of Chemical Physics* p126-145.
- Martins A, Vasconcelos M, Sousa R (1996).** Flower as a coagulant agent for cheese making. Short characterization. *Le Lait*, 76:473-477.
- Mathieu J (1998).** Initiation à la physicochimie du lait. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 220p.

**Merveille C (2011).** Etude structurale et rhéologique des systèmes mixtes casernâtes carraghenanes. Autre. Université du Maine <<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00652071>>.

**Mietton B, Desmazeaud H, Roissart, Weber (1995).** Transformation du lait en fromage, Bactéries lactiques, vol.2, Chap.IV, 3è édition, Lorica, 133p.

**Murray R, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M, Tenover F, Tenover R (2003).** *Manual of Clinical Microbiology* (8th ed.). Herdon, VA, United States of America: American Society for Microbiology.

**Nouani A, Dako E, Morsli A, Belhamiche N, Belbraouet S, Bellal M, Dadie A (2009).** Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J. Food Technology*, 7:20-29.

**Noble J, Bailey M (2009).** Quantitation of protein. *Methods in enzymology*, 463:73-94.

**Oner M, Akar B (1993).** Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and it's utilization in Gaziantep cheese production, 26:318-321.

**Oukabli A (2003).** Le figuier un patrimoine génétique diversifié à exploiter. Unité de recherche sur l'amélioration des plantes et conservation des ressources phyto-génétiques, 5,2, n°106, 4p.

**Payne T (2009).** Enzymes in Meat Systems Enzymes. Chapter 8. R. Tarté (ed.), *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*. 26p.

**Rifaat I, El-shibini S, Aabd-salam M, Fahim A (1970).** studies on milk clotting enzymes from higher plants. *Journal of dairy science*, 23:151-154.

**Robbins B (1930).** A proteolytic enzyme in ficin, the anthelmintic principle of leche de higueron. *Journal of Biological Chemistry*, 87:251-257.

**Rodier (2005).** L'Analyse de l'eau: Eaux Naturelles, Eaux Résiduaires, *Eau de Mer*. 8th ed. by Dunod, Paris.

**Siar H (2014).** *Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait*. Mémoire de Magister. Sciences Alimentaires. I.N.A.T.A.A. Université de Canstantine 1, p8-60.

**Malcata F, Silva S (2005).** 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*, 88:1947-1954.

**Valérie M (2002).** *Distribution de l'azote entre le lait, les fèces et l'urine chez la vache laitière alimentée avec des rations déficitaires en azote fermentescible*. Thèse doctorat en science agronomique, l'institut National Polytechnique de Lorraine, 216p.

**Vidaud J (1997).** Le figuier monographie de CTIFL (centre technique interprofessionnel des fruits et légumes). 267p.

**Vignola C (2002).** Science et technologie du lait, transformation du lait. Presses internationales polytechnique, Québec, 608p.

**Vilain A (2010).** Qu'est-ce que le lait ?. *Revue française d'allergologie*, 50:124-127.

**Vilmorin J (2003).** Histoire d'arbre. Ed. Jean Paul Gisserot. 74p.

**Walstra P, Bloomfield V, Wei G, Jenness R (1981).** Effect of chymosine on the hydrodynamic diameter of casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 669-258-259.

**Walstra P (1999).** Casein sub-micelles: do they exist?. *International Dairy Journal*, 9-189-192.

**Williams D, Sgarbieri V, Whitaker J (1968).** Proteolytic Activity in the Genus Ficus. *Plant Physiology*, 43-1083-1088.

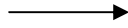
**Zare R (2013).** *Angular momentum: understanding spatial aspects in chemistry and physics.* Wiley-Interscience.

**Zikiou A (2013).** La coagulation du lait par l'extrait des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*). Mémoire de magister, université frères Mentouri Constantine. Institut de la Nutrition, Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires, 136p.

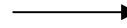
## Annexe 1 : Extraction de la ficine



Récupération de latex



Latex



Extrait brute de ficine

## Annexe 2 : Analyse sensoriale du fromage type : camembert

### Focus Group

**On souhaite connaître les caractéristiques sensoriale, en particuliers les attributs de texture, de deux types de fromages dont la formulation varie dans la concentration et type d'enzyme coagulante ajoutée.**

**1/ Que est ce que vous valoriser le plus d'un fromage type camembert ?**

**Le goût et l'arome**

**2/ Avez-vous une préférence pour un type de texture ? Laquelle ?**

**La texture molle ou spongieuse**

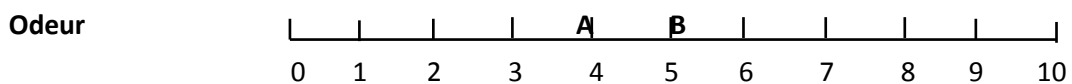
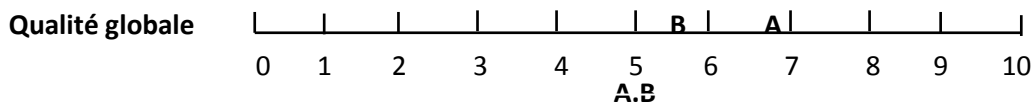
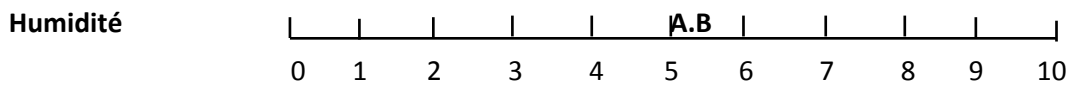
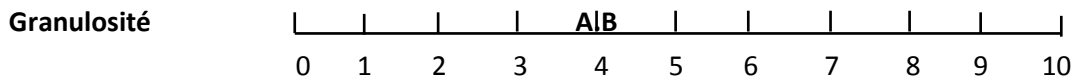
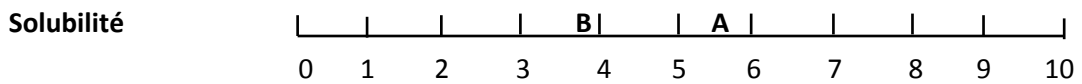
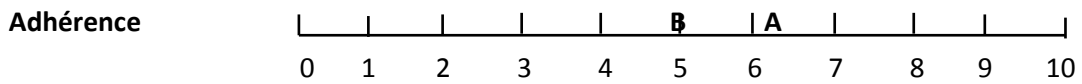
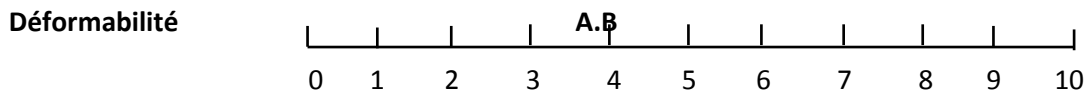
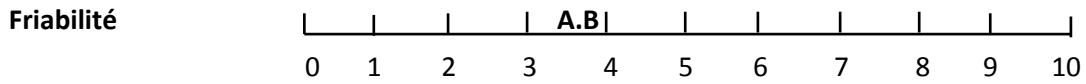
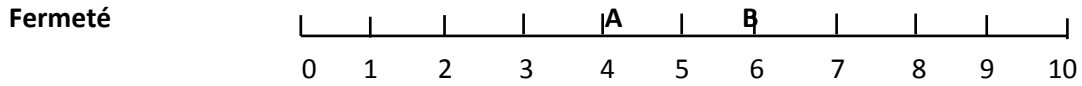
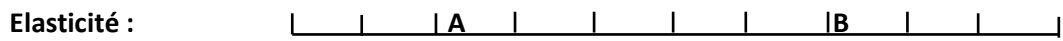
**3/ Quelle est la forme géométrique et de surface préférée : pour les récepteurs tactiles et visuels ?**

**Triangulaire**

**4/ Décrivez les caractéristiques de texture, saveur et autres sensations que vous produisent les échantillons suivants de camembert :**

Camembert A (présure) et B (ficine):

Echelle



## Agzul

Amesyarun uxeddim agi d azraw n wamek ar ad yili ubeddil n uëeqqar n la présure s la ficine am uëeqqar azenkta yessikilin ayefki, tiwđin yer yeswi agi iwelh-ay yer usufey n la ficine seg liqa n tebaxsisin (tanaqelt, tamayrust), ak d tufka n tayara i uđric anzimi id nekkes, aya s ubeggen n tarmuđt-nni-ines n usikel, leđahd n usikel ak d tarmuđt-is n ubeddel n teyssa i teprutiyyin « proteolytique »

Seg tama niđen, yella-d uerađ n ufares n yewwen n šşenf uyunan bu trektit i ređben i yemucaæn s yisem n kamumber s usemres n la ficine deg umkan n le présure amzenzi, aya yettuhegga-d deg luzin n la VALLÉE.

Igemađ igejdanen id-yefyen sekanen-d d akken tikkest n la ficine tesëa tarmuđt tasiklant n 103,458 U.P, leđahd asiklan n 1/21258 d tarmuđt n ubeddel n teyssa n teprutiyyin id yefkan leqidar n 139 µg d agdazal n tyrosine iw ml n tikkest n la ficine.

Ayunan bu teraktit taređbant n šşenf kamumber id-yettufersen s la ficine yesëa amerkid organoleptique yufraren yef uyunan inigi, deya s teraktit-is i wumi težad ređaba s uqissi n ukeččum n wazal n 2,5mm s umegada d win n le présure i yewđen azal n 3,6mm.

Tazrawt agi tesbeggen-d d akken takkest n la ficine tezmer ad tettef adeg n le présure deg ufares ayunayan, akken tuklal dayen ad telđu ula yer ufares n lešnaf nniđen n uyunan.



## Summary

The purpose of the present work is to study the possibility of substituting ficin for rennet as a vegetable coagulant of milk. In order to achieve this objective, we extracted the ficin from latex of the fig tree (*Ficus carica L.*) and the characterization of the enzyme extract obtained by the determination of the coagulating activity, the coagulating force and the Proteolytic activity.

On the other hand, a test for the manufacture of a "Camembert" soft cheese using ficin as a substitute for commercial rennet was carried out in the VALLEE cheese factory.

The main results obtained showed that the ficin extract had a coagulant activity of 103.458 U.P, a coagulating force of 1/21258 and a proteolytic activity estimated at 139 ug of tyrosine equivalents per ml of ficine extract.

The "Camembert" soft cheese obtained with ficin has a better organoleptic quality than that of control cheese and a softer texture with penetrometry of 2.5 mm compared to that of rennet of the order of 3, 6 mm.

This study demonstrated that ficin extract can replace rennet in cheese making and this study deserves to be expanded in the manufacture of different types of cheese.

**Key words:** *Ficus carica L*, Latex, Ficin, Protease, Casein, Cheese.

## ملخص

يهدف هذا العمل إلى توصيف إنزيم الفيسين ( la ficine ) المستخلص من النسغ الكامل لشجرة التين. هذا التوصيف يهدف أساسا إلى تحديد نشاط و قوة التخثر، كما قمنا بدراسة قوة إمهاة البروتينات و مختلف التفاعلات التي تشارك في تشكل خثرة الحليب مقارنة مع الانفحة الحيوانية (البريزور).

من جهة أخرى حاولنا إنتاج جبن طري من نوع "كامبير" باستعمال مستخلص الفيسين كبديل للبريزور الذي تم إنجازة في لافالي للجبن الطري.

النتائج المحصل عليها أظهرت أن مستخلص الفيسين يمتلك نشاط تخثري يقدر ب:  $103,458 \text{ up}$  و قوة تخثر تقدر ب:  $21258/1$  وقوة إمهاة البروتينات تقدر ب:  $139 \mu \text{ g}$  من التروزين لكل ملتر من الفيسين. و الجبن الطري "كامبير" المحصل عليه باستعمال مستخلص الفيسين اظهر نوعية مذاقية أفضل من الجبن الطري في العينة المقارنة و ملمس جد ناعم, مع مقيا  $\square$  اختراق  $2,5$  ملم مقارنة مع الجبن المصنوع بالبريزور الذي يقدر مقيا  $\square$  اختراقه ب:  $3,6$  ملم.

إن هذه الدراسة أثبتت ان الفيسين يمكن أن تحل محل البريزور في إنتاج الأجبان وينبغي أن تمتد إلى صنع أنواع أخرى من الأجبان.

**كلمات مفتاحية:** الفيسين, نسغ, البريزور, صناعة الجبن الطري.

## Résumé

L'objectif du présent travail est d'étudier la possibilité de substituer la présure par la ficine comme agent coagulant végétal du lait. Pour atteindre cet objectif, nous avons procédé à l'extraction de la ficine à partir de latex du figuier (*Ficus carica L.*) et la caractérisation de l'extrait enzymatique obtenu par la détermination de l'activité coagulante, la force coagulante et l'activité protéolytique.

D'autre part, un essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type «Camembert» en utilisant la ficine en tant que succédané de présure commerciale a été réalisé au sein de la fromagerie la VALLÉE.

Les principaux résultats obtenus ont montré que l'extrait de la ficine présente une activité coagulante de 103,458 UP, une force coagulante de 1/21258 et une activité protéolytique estimée à 139 µg d'équivalent tyrosine par ml d'extrait de la ficine.

Le fromage à pâte molle type « Camembert » obtenus avec la ficine présente une qualité organoleptique meilleure que celle de fromage témoin et une texture plus molle avec une pénétrométrie de 2,5 mm en comparaison avec celle de la présure de l'ordre de 3,6 mm.

Cette étude a démontré que l'extrait de la ficine peut remplacer la présure dans la fabrication fromagère et cette étude mérite d'être élargie dans la fabrication de différents types de fromage.

**Mots clés:** *Ficus carica L*, Latex, Ficine, Pprotéase, Caseines, Fromage.