

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE CONSTANTINE -1-**  
**Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires**  
**I.N.A.T.A.A.**

N° d'ordre :  
N° de série :

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de magister en Sciences**  
**Alimentaires;**  
**Option: Technologies Alimentaires.**

*Thème :*

---

**Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du**  
**figuier comme agents coagulants du lait.**

---

Présenté par:  
**SIAR El-Hocine**

**Soutenu le : 25 juin 2014**

Devant le Jury composé de :

<b>Président :</b>	KHELIFI D.	Professeur S.N.V. U.C.-1-
<b>Rapporteur :</b>	ZIDOUNE M. N.	Professeur I.N.A.T.A.A. U.C. -1-
<b>Examineurs:</b>	BENATALLAH L.	M.C/A I.N.A.T.A.A. U.C.-1-
	OULAMARA H.	M.C/A I.N.A.T.A.A. U.C. -1-

*Année universitaire 2013-2014.*

## *Remerciements*

*Avant tout je tiens à remercier celui qui nous a créés, protégé, aidé et celui qui m'a donné la force, la patience et le courage pour pouvoir accomplir mon travail de magister dans les meilleures conditions en disant « Dieu Merci ».*

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

*Je tiens également à remercier*

*Mr Pr. KHELIFI D. maitre d'avoir accepté de présider le jury. Ainsi que Mm. BENATALLAH L. et Mm. OULAMARA H. d'avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver, ici l'expression de ma reconnaissance et mon respect.*

*Je tien a remercier Monsieur NAMOUNE H. ainsi que tous les enseignants qui ont assurés le bon déroulement de l'année théorique de ma formation, qu'il trouve ici toute ma reconnaissance*

*Je remercie la société SAFILAIT ainsi que l'ensemble de son personnel pour m'avoir accueilli et permis d'effectuer les différents tests et analyses et pour avoir mis à ma disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation d'une partie de ce travail.*

*Je remercie particulièrement, les membres de l'équipe T.E.P.A. du laboratoire L.N.T.A. pour leur contribution et le temps qu'ils ont bien consacrer pour la réalisation de ce mémoire.*

*Je tien aussi a remercié l'ensemble de personnel de l'I.N.A.T.A.A. administrateurs, enseignants et laborantins pour leurs service et encouragements qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Le soutien et l'encouragement de : Alla, Abdelah, Ferhat, Smail, Bachir, Hayet H. Awatef, Anis, Loucif, Adel, Sabrina, Ouabda, Sarah, Naouel, ainsi que tous mes collègues de la promotion magistère 2011, ont été très importants pour la réussite de mes études. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde affection.*

*Je remercie aussi, tous ceux et toutes celles qui m'ont aidé ou encouragé, à quelque titre ou degré que ce soit, à entreprendre et achever ce mémoire.*

# *DEDICACES*

*Je dédie ce travail*

*A ma très chère mère pour tous ses sacrifices et ses soucis pour les  
besoins de nos études,*

*A mon très cher père pour tous les efforts fournis afin de nous voir un  
jour réussir nos projets et nos études,*

*A mes sœurs Malika et Wardia et Fatma ainsi que son mari Hamou  
et ses filles Aya et Esrae pour leurs soutien morale*

*A mes frères, Boudjamaa et Idir ainsi que Lahcen et sa femme  
Faroudja pour leur soutien et encouragements sans limite,*

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

*A tous mes amies et amis et plus particulièrement celles et ceux que  
j'ai connus à INATAA, Constantine (Allilou, Abdou, Ferhat, Hayet, S,*

*N, S, O)*

# *Sommaire*

**SOMMAIRE****Liste des figures****Liste des tableaux****Liste des abréviations**

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

**Etude bibliographique**

I. Présure et succédanés de présure .....	03
I.1. La présure .....	03
I.2. Les succédanés de présure .....	03
I.2.1. Succédanés d'origine microbienne .....	03
I.2.1.1. Succédanés d'origine bactérienne .....	04
I.2.1.2. Succédanés d'origine fongique .....	04
I.2.2. Succédanés d'origine animale .....	04
I.2.2.1. La pepsine bovine .....	05
I.2.2.2. La pepsine porcine .....	05
I.2.2.3. La pepsine de poulet .....	05
I.2.3. Succédanés d'origine végétale .....	07
I.2.3.1. Généralité sur les enzymes d'origine végétale .....	07
I.2.3.2. Cas de l'extrait de ficine .....	07
II. Le lait .....	10
II.1. Dénomination légale du lait cru .....	10
II.2. Composition chimique globale de lait .....	11
II.2.1. Eau .....	11
II.2.2. Matière grasse .....	11
II.2.3. Les vitamines .....	12
II.2.4. Glucides .....	12
II.2.5. Matières minérales (taux de cendres) .....	12
II.2.6. Matières azotées .....	12
III. Mécanismes de coagulation .....	15
II.1. Coagulation acide .....	16
II.2. Coagulation mixte .....	16
II.3. Coagulation enzymatique .....	16
III.3.1. Phase primaire .....	16
III.3.2. Phase secondaire .....	17

III.3.3. Phase tertiaire .....	18
VI. La fabrication des fromages .....	18
VI.1. Définition des fromages .....	18
VI.2. Le fromage à pâte molle exemple « camembert ».....	18
VI.2.1. Définition .....	18
VI.2.2. Technologie de fabrication des fromages .....	18
VI.3. Les défauts des fromages .....	21

## **Partie expérimentale**

### **I. Matériel et méthodes**

I.1. Matières premières .....	22
I.1.1. Le lait .....	22
I.1.2. La présure .....	22
I.1.3. La ficine .....	22
I.1.4. La pepsine .....	23
I.2. Caractérisation du lait .....	25
I.3. Caractérisation de l'extrait enzymatique .....	26
I.3.1. Teneur en protéine .....	26
I.3.2. Activité coagulante .....	27
I.3.3. Force coagulate .....	29
I.3.4. Mesure de l'activité spécifique .....	29
I.3.5. Activité protéolytique .....	29
I.3.6. Profile électrophorétique.....	30
I.4. Détermination des conditions optimales d'activité des extraits de ficine et pepsine .....	31
I.4.1. pH optimal .....	31
I.4.2. Température optimale .....	32
I.4.3. Concentration en CaCl <sub>2</sub> .....	32
I.5. Etude des interactions impliquées dans la formation de coagulum .....	32
I.6. Essai fabrication d'un fromage à pâte molle type « Camembert » .....	33
I.6.1. La technologie de fabrication de Camembert au niveau de SAFI Lait .....	33
I.6.2. Analyses physicochimiques de lait utilisé pour la fabrication du fromage .....	36
I.6.3. Analyse effectuées pour les fromages fabriqués .....	37
I.6.3.1. Echantillonnage.....	37
I.6.3.2. Analyses physico-chimiques des fromages fabriqués.....	37
I.6.4. Suivi de l'évolution de la texture.....	38

---

I.6.5. Suivi de la protéolyse.....	38
I.6.6. Analyses sensorielles .....	41
<b>II. Résultats et discussion</b>	
II.1. Caractéristiques de lait utilisé .....	44
II.2. Caractéristiques des extraits enzymatiques .....	44
II.2.1. Activité protéolytique .....	46
II.2.2 Profil électrophorétique .....	47
II.3. Conditions optimales de coagulation .....	49
II.3.1. Effet de pH .....	49
II.3.2. Effet de la température .....	50
II.3.3. Effet de la concentration en CaCl <sub>2</sub> .....	51
II.4. Les interactions impliquées dans le gel obtenu par l'extrait de ficine et de pepsine	52
II.4.1. Interaction hydrophobes (dissocié par l' SDS).....	52
II.4.2. Intéraction hydrogène (dissocié par l'urée).....	54
II.4.3 Poids calciques (dissocié par l'EDTA).....	55
II.5. Essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type « camembert » par l'utilisation de la ficine ou de la pepsine de poulet .....	57
II.5.1. Caractéristiques physicochimiques du la utilisé .....	57
II.5.2. Paramètres physicochimiques des fromages fabriqués .....	58
II.5.3. Le rendement .....	59
II.5.4. Evolution de la texture des fromages .....	59
II.5.5. L'évolution de la protéolyse.....	61
II.5.5.1. Evolution qualitative .....	61
II.5.5.2. Evolution quantitative.....	65
II.5.6. Evolution des caractéristiques organoleptiques.....	67
Conclusion .....	73
Références bibliographiques .....	76
Annexes	

## Liste des figures

<b>Figure n° 01 : (A) Appareil digestif du poulet ; (B) Complexe stomacal du poulet ; (C) Anatomie du complexe stomacal des Galliacées .....</b>	<b>06</b>
<b>Figure n° 02 : photo d'un figuier .....</b>	<b>08</b>
<b>Figure n° 03 : micelle de caséine vue par un microscope électronique .....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 04 : Structure de la micelle de caséine .....</b>	<b>15</b>
<b>Figure n° 05 : phases de coagulation de lait et formation de réseau .....</b>	<b>17</b>
<b>Figure n° 06 : Diagramme générale de fabrication de fromage a pate mole type camember .....</b>	<b>20</b>
<b>Figure n° 07: Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet selon BOHAK, (1970) .....</b>	<b>24</b>
<b>Figure n° 08 : Courbes étalonS obtenue avec : A : BSA ; B : la caséine et C : la tyrosine ....</b>	<b>28</b>
<b>Figure n° 09 : Diagramme de fabrication Camembert adopté par la laiterie SAFILAIT .....</b>	<b>35</b>
<b>Figure n° 10 : Préparation de l'échantillon pour le test de pénétrométrie. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figure n ° 11 : Extraction des fractions protéiques solubles et insolubles à pH= 4,6 (FALLICO <i>et al.</i>, 2004) .....</b>	<b>40</b>
<b>Figure n° 12 : Quantité de produit d'hydrolyse libérés par les extraits enzymatique étudiées .....</b>	<b>47</b>
<b>Figure n° 13: Profils électrophorétiques sur SDS-PAGE des extraits de ficine et de pepsine de poulet .....</b>	<b>48</b>
<b>Figure n° 14 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de ficine, de pepsine et de présure .....</b>	<b>49</b>
<b>Figure n° 15 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de ficine, de pepsine de poulet et de la présure.....</b>	<b>50</b>
<b>Figure n° 16 : Effet de la concentration de CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante de l'extrait de ficine, de pepsine et de présure animale.....</b>	<b>52</b>



<b>Figure n° 17 :</b> Effet de SDS sur les gels présure, pepsine et ficine.....	53
<b>Figure n° 18:</b> Effet de l'urée sur les gels présure, pepsine et ficine.....	55
<b>Figure n° 19 :</b> Effet de l'EDTA les gels présure, pepsine et ficine .....	56
<b>Figure n° 20 :</b> Evolution de la profondeur de pénétration de cône du pénétromètre dans les trois fromages au cours de l'affinage .....	60
<b>Figure n° 21 :</b> profil électrophrétique des protéines du fromage issu de la coagulation par l'extrait de ficine .....	63
<b>Figure n° 22 :</b> profil électrophrétique des protéines du fromage issu de la coagulation par la pepsine du poulet.....	64
<b>Figure 23 :</b> profil électrophrétique des protéines du fromage témoin (issu de la coagulation par une présure microbienne).....	65
<b>Figure n° 24 :</b> Evolution du taux de protéines solubles à pH = 4,6 par rapport aux protéines totales des différents fromages au cours de l'affinage .....	66
<b>Figure n° 25 :</b> Profil sensoriel des trois fromages au 1 <sup>er</sup> jour de fabrication .....	68
<b>Figure n° 26:</b> Profil sensoriel des trois fromages au 6 <sup>ème</sup> jour d'affinage.....	69
<b>Figure n° 27 :</b> Profil sensoriel des trois fromages au 13 <sup>ème</sup> jour d'affinage.....	69
<b>Figure n° 28 :</b> Profil sensoriel des trois fromages au 20 <sup>ème</sup> jour d'affinage.....	70
<b>Figure n° 29 :</b> Profil sensoriel des trois fromages au 28 <sup>ème</sup> jour d'affinage.....	70
<b>Figure n° 30:</b> Profil sensoriel des trois fromages au 37 <sup>ème</sup> jour d'affinage.....	71

## Liste des tableaux

<b>Tableau n° 01</b> : Composition générale du lait de vache (FILION, 2006).....	11
<b>Tableau n° 02</b> : proportions relatives des protéines de sérum (g/100g des protéines totales du sérum) de quelques mammifères (HUPPERTZ <i>et al.</i> , 2006).....	13
<b>Tableau n° 03</b> : comparaison entre un caillé lactique (voie acide) et un caillé présure (voie enzymatique)(VIGNOLA, 2002).....	15
<b>Tableau n° 04</b> : composition des gels d'acrylamide en milieu urée .....	40
<b>Tableau n° 05</b> : caractéristiques physicochimique de la poudre de lait et de substrat de BERRIDGE.....	44
<b>Tableau n° 06</b> : principales caractéristique des enzymes extraites .....	44
<b>Tableau n° 07</b> : composition physicochimique du lait cru utiliser pour la fabrication fromagère .....	57

## Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

ANOVA : Analyse de la variance

ANP : Azote Non Protéique

BSA : Bovin Sérum Albumine

CMP : Caséinomacropéptide

EDTA : Ethyle Diamine Tétra Acétique

ESD : Extrait Sec Dégraissé

EST : Extrait Sec Total

FAO : Food and Agriculture Organization

FIL : Federation International du Lait

ISO : International Standard Organization

MG : Matière Grasse

Rdt : Rendement

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TCA : Acide Trichloacétique

DTT : DL-Dithiothéite

T.E.P.A. : Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires

U.A.C. : Unité d'Activité Coagulante

U.P. : Unité présure

$\alpha$ 1-CN : Caséine  $\alpha$ 1

$\beta$ -CN : Caséine  $\beta$

Ps : Protéines solubles

Pt : Protéines totales

# *Introduction*

La fabrication du fromage est apparue il y a 8000 ans, peu après la domestication des animaux. A l'origine, l'intérêt majeur de la transformation du lait en fromage était de conserver les principaux constituants du lait. Aujourd'hui, il s'agit plutôt d'un aliment, possédant des qualités nutritionnelles indéniables (CHOLET, 2006).

La première étape de fabrication du fromage est la coagulation, considérée comme la clé de la réussite de n'importe quelle préparation. Elle consiste à la formation d'un gel suite à des modifications physico-chimiques intervenant sur les micelles de caséines.

L'agent coagulant le plus anciennement utilisé en fromagerie est la présure. Cette enzyme est extraite à partir de la caillette de veau non sevré. Elle est constituée de 80 % chymosine et de 20% pepsine (DESMAZEAUD, 1997). Bien qu'elle soit encore l'enzyme la plus utilisée en fromagerie, sa production connaît une pénurie mondiale. Elle est due essentiellement à une augmentation croissante de la production et de la consommation des fromages et à l'impossibilité d'augmenter en parallèle la production de présure (BANGA-MBOKO *et al.*, 2002).

Pour des raisons sociales et religieuses comme l'utilisation interdite de la présure dans certains pays tels que l'Inde et l'Israël, les questions qu'elle pose dans les pays musulmans à cause des rituels d'abattage et l'interdiction d'utilisation de la pepsine porcine, ainsi que la non stabilité de la qualité et des prix et la difficulté d'approvisionnement en présure, la recherche de nouvelles sources d'enzymes capables de remplacer la présure traditionnelle dans l'industrie fromagère a été imposée.

Parmi ces succédanés, les protéases d'origine végétale sont très anciennement utilisées dans des préparations traditionnelles telles que celles provenant de l'artichaut, du chardon et de latex du figuier. D'autres enzymes ont été testées telles que les protéases d'origine fongique synthétisées par diverses espèces. Il existe aussi des succédanés d'origine animale tels que les pepsines porcines, bovines et les pepsines extraites des proventricules des volailles.

Bien qu'elle ait un potentiel de production en succédanés capables de subvenir aux besoins en agents coagulants, l'Algérie reste dépendante des fournisseurs étrangers en matière d'approvisionnement et importe la quasi-totalité des quantités d'enzymes nécessaires à l'industrie fromagère. En 2011, environ 25 mille tonnes de fromages ont été vendus dans le marché algérien. Selon l'Office National des Statistique (O.N.S), l'industrie fromagère

algérienne a utilisé près de 1,5 tonne de présure et ses substituts. Le coût élevé d'importation (plus de 102 millions de Dollars) ainsi que la dépendance de l'Algérie vis-à-vis des fournisseurs étrangers en matière d'approvisionnement en présure et/ou ses succédanés, nous a encouragé à mettre en valeur des sources locales pour la production d'agents coagulants utilisables en industrie fromagère.

Bien que la recherche des succédanés de présure soit depuis de nombreuses années entamée en Algérie, les études ont montré un intérêt certain de ces enzymes sur les plans de la faisabilité et de la stabilité technologique. Cependant, ces recherches menées au stade expérimental n'ont jusqu'à nos jours, pas suscité l'intérêt d'une application industrielle. Parmi ces travaux, nous évoquons ceux menés par l'équipe de recherche T.E.P.A. (Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires) de l'I.N.A.T.A.A qui ont porté sur l'extrait des fleurs de cardon (ZIKIOU, 2013) et sur la pepsine extraite des proventricules de poulet (ADOUI, 2007 ; BOUGHALUOT, 2007 ; BENYAHIA-KRID *et al.*, 2010). Vu l'importance des sources disponibles de notre pays, nous avons jugé important d'entreprendre une étude comparative sur la pepsine de poulet et la ficine extraite de latex de figuier en offrant aux investisseurs algériens plus d'opportunités pour exploiter la biodisponibilité locale.

Ces deux extraits sont exploités depuis une époque lointaine pour la production des fromages traditionnels Algériens, tels que le fromage *Takammérit* consommé dans les régions sud de l'Algérie préparé par utilisation de la pepsine de poulet ainsi que le fromage *Agugli* préparé par utilisation de latex de figuier (ficine) principalement dans la Kabylie en l'Algérie.

L'objectif de ce travail est la valorisation des pratiques traditionnelles par la caractérisation de l'extrait clarifié de la pepsine de poulet et de l'extrait brut de la ficine, ainsi que par l'étude de la possibilité de leur utilisation comme succédanés de présure en fromagerie. Pour parvenir à ces objectifs nous avons procédé comme suit :

- Récupération des matières premières (latex de figuier et proventricules de poulet) ;
- Extraction des systèmes enzymatiques contenus dans chacune des matières premières (ficine et pepsine de poulet);
- Caractérisation des extraits enzymatiques obtenus (ficine et de pepsine);
- Détermination du type d'interactions impliquées dans la formation et le maintien des coagulums (gels);
- Utilisation des extraits étudiés dans la fabrication d'un fromage à pâte molle type « Camembert » par comparaison avec celui obtenu avec la présure microbienne.

*Etude*  
*bibliographique*

## **I. Présure et succédanés de présure**

La présure et ces succédanés sont des enzymes capables de coaguler le lait. Elles sont d'origine animale, végétale ou microbienne (ECK et GILLIS, 1997 ; SCRIBAN, 1999 ; VIERLING, 2003). Les enzymes coagulantes sont des protéases. Elles ont une action analogue à celle de la présure sur les caséines. Les inconvénients des succédanés de présure sont la baisse du rendement, la texture molle et les goûts anormaux dû à leur activité protéolytique (ALAIS, 1971 ; AMIOT, 2002). L'utilisation d'enzymes protéolytiques pour la coagulation est parmi les plus anciennes opérations de transformation alimentaires (RAMET, 1985 ; HUPPERTZ *et al.*, 2006).

### **I.1. La présure**

Selon la fédération internationale du lait (FIL) la dénomination «présure» est donnée à l'extrait coagulant provenant des caillottes de jeunes ruminants abattus avant sevrage (RAMET, 1985 ; ANDREN, 2002). Elle est traditionnellement à la base de la fabrication des fromages (VIERLING, 2003). De petites quantités de présure sont produites à partir de l'estomac de chevreau et d'agneau (RAMET, 1985 ; DESMAZEAUD, 1997).

La présure se compose de deux fractions, 80% chymosine et 20% pepsine (SCOTT, 1981 ; HUPPERTZ *et al.*, 2006). La chymosine (EC 3.4.23.4) est la principale enzyme de coagulation du lait présente dans la présure. C'est une protéase acide, sécrétée sous forme de proenzyme inactive appelée prochymosine. L'activation de la prochymosine en chymosine se fait spontanément dans la caillotte aux pH inférieurs à 5,0 par hydrolyse de l'extrémité N-terminale de la molécule (MAHAUT *et al.*, 2000, 2003). Elle a un poids moléculaire de 35 KDa avec 323 résidus d'acides aminés (SCRIBAN, 1999).

### **I.2. Les succédanés de présure**

De nombreuses raisons ont stimulées la recherche de succédanés capable de remplacer la présure et de trouver de nouvelles sources d'enzymes pour l'industrie. Selon BOUDIER, (1974), RAMET, (1985) ; ECK *et* GILLIS, (1997) ; KUMAR *et al.*, (2005), les principales raisons sont :

A. Sociales et religieuses, où l'utilisation de la présure est interdite dans certains pays tel que l'Inde et l'Israël ;

B. La non stabilité de la qualité et le prix élevé de la présure industrielle sous l'effet de l'élevage moderne et l'augmentation de la production fromagère mondiale ;

C. économiques où la présure ne peut plus répondre à la demande croissante ;



D. Nécessité pour l'industrie fromagère d'approvisionnement régulier en enzymes coagulante.

### **I.2.1. Succédanées d'origine microbienne**

Le développement de domaine microbiologique a permis de mieux comprendre la synthèse des enzymes chez les microorganismes, ce qui a orienté la production industrielle vers le processus fermentaire (SANDHYA *et al.*, 2005). Un grand nombre de protéases susceptibles de coaguler le lait sont obtenues à partir de la culture de microorganismes. (DALGLEISH, 1997 ; RAMET, 1985). De plus à l'inverse des protéases gastriques qui sont synthétisées sous formes de zymogènes inactifs, les protéases microbiennes sont produites sous formes active (DALGLEISH, 1997).

#### **I.2.1.1. Succédanés d'origine bactérienne**

Les souches de *Bacillus* ont été les plus étudiées pour la production d'enzymes coagulantes en particulier *Bacillus subtilis*, *B. cereus* et *B. polymexa*. Des essais assez poussés ont mis en évidence une activité protéolytique trop forte par comparaison à la présure dans les même conditions de la coagulation et les caillés obtenus manquaient de cohésion (ALIAS, 1971 ; MAHON et BROWN, 1985).

#### **I.2.1.2. Succédanés d'origine fongique**

Ils ont donné des résultats, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure; plusieurs préparations sont déjà commercialisées et utilisées à plus ou moins grande échelle selon les pays. Ces préparations proviennent de trois genres de moisissures : *Endothia parasitica* (E.p.), *Mucor pusillus* (M.p.), *Mucor miehei* (M.m.) (RAMET, 1985). Certains chercheurs n'ont trouvé pratiquement aucune différence entre les fromages fabriqués par ces enzymes et ceux fabriqués par la présure (PAQUET, 1977). D'autre part, une large variété de protéases sont également élaborées par les moisissures (RAO *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2006).

### **I.2.2. Succédanés de présure d'origine animale**

De nombreuses protéases d'origine animale ont fait l'objet d'expérimentation en vue d'une potentielle utilisation en fromagerie. Cependant, toutes ne sont pas pour autant aptes à la fabrication fromagère; seules les pepsines porcines et bovines présentent un intérêt industriel (ECK, 1987).

### **I.2.2.1. La pepsine bovine**

La pepsine bovine (E.C.3.4.23.1) est extraite à partir des caillottes des veaux sevrés. Elle a un poids moléculaire de 33,4 KD et se compose de deux pepsine I et II (RODNEY *et al.*, 1988). Elle représente environ 6% de l'activité protéolytique de la présure commerciale et elle est proche de celle de la chymosine (BARBANO et RASMUSSEN, 1992). Elle est utilisée en fromagerie en mélange avec la présure à des proportions égales (RAMET, 1997).

### **I.2.2.2. La pepsine porcine**

La pepsine porcine (E.C.3.23.2.) est formée de 321 résidus d'acides aminés. Son poids moléculaire est de 35 KDa (KAGEYAMA et TAKAHASHI, 1976). Les principaux inconvénients limitant son utilisation comme agent coagulant de lait sont : la forte dépendance de son activité de pH. En effet, aux valeurs de pH utilisée en fromagerie (pH 6,5 et T° = 30°C) la pepsine porcine est partiellement inactivée et après une heure elle perd 50% de son activité (ANDREN, 2002, RODNEY *et al.*, 1988) ainsi que sa forte activité protéolytique (BRULE *et al.*, 1997).

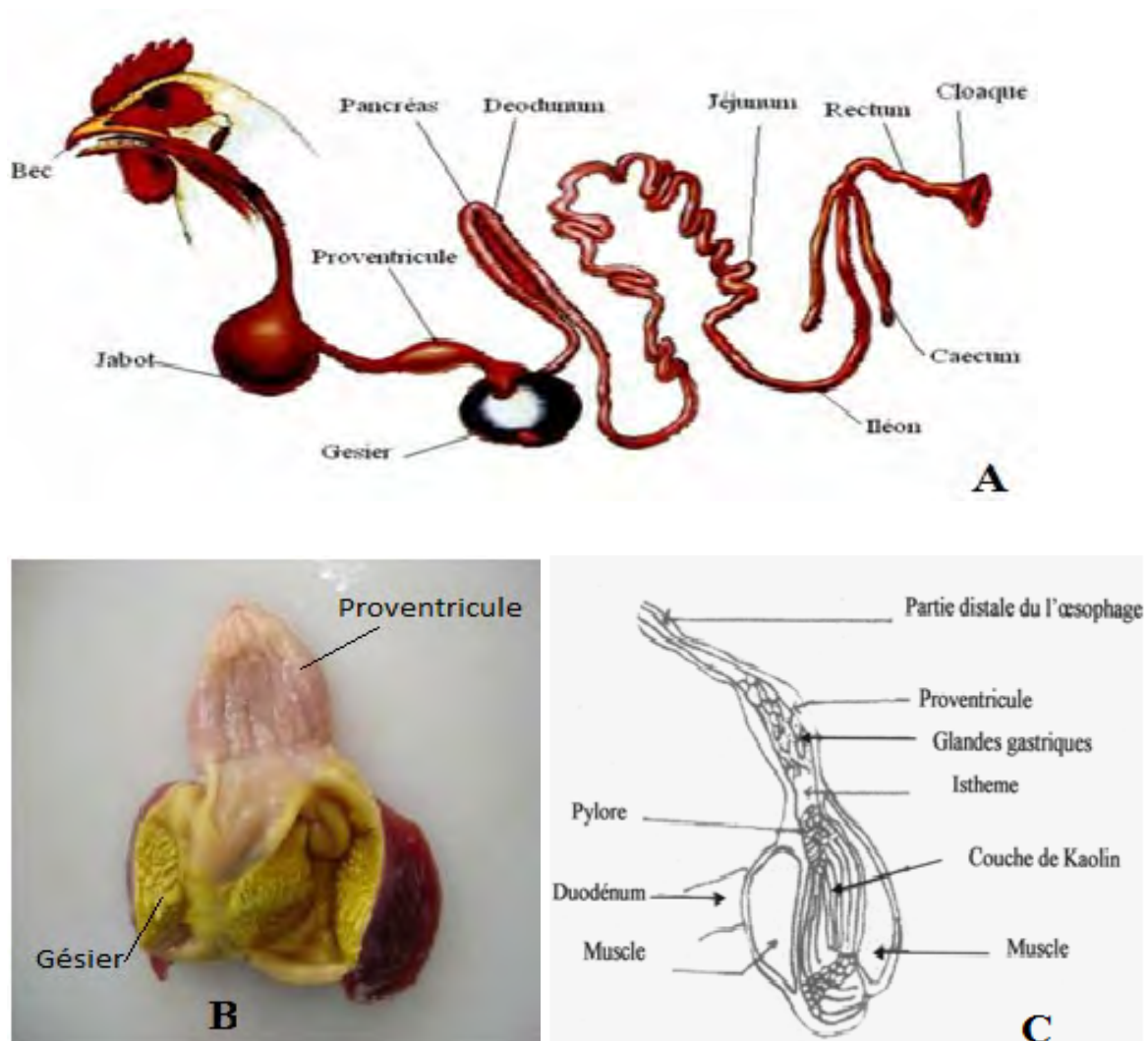
### **I.2.2.3. La pepsine de poulet**

La pepsine de poulet est une enzyme extraite à partir des proventricules du poulet (*Gallus gallus*) considérés comme un sous-produit d'abattage. Ces organes de longueur moyenne de 3 cm, situé au-dessus du gésier recouvert d'une couche d'épithélium formé de cellules cylindriques visibles à l'œil nu. Ces cellules sont responsables de la sécrétion de pepsinogène et de l'acide chlorhydrique (ALAMAREOT, 1982). La figure 01 représente l'appareil digestif du poulet, complexe stomacal du poulet et anatomie du complexe stomacal des Galliacées.

BOHAK, (1969) estime que le pepsinogène de poulet a un poids moléculaire de 43 KDa avec 387 résidus d'acides aminés, alors que la pepsine purifiée a un poids moléculaire de 35 KDa et 308 résidus d'acide aminé. GREEN et LLEWELLIN, (1973), ont confirmé ce résultat (un poids moléculaire de 34 à 36 KDa).

La pepsine de poulet est sensible au changement de pH. En effet, l'optimum de son activité est entre pH 1,5 et 4,5. A pH 1,5 elle est active à 90% et elle perd son activité avec l'augmentation de pH pour atteindre 35% de son activité maximale à pH 4,5 et reste stable jusqu'à pH de 8 et elle est totalement inactivée au-delà de pH 8,5, son pH optimum sur l'hémoglobine est de 2,8 (BOKAK, 1969). CREVIEU-GABRIEL *et al.*, (1999) ont rapportés

que son pH optimal est de 2,5 à 3 sur l'hémoglobine. Le pH optimal de la pepsine de poulet est de 1 à 1,5 sur les protéines des pois, 1,5 sur le gluten et 2,5 à 3 sur l'hémoglobine (CREVIEU-GABRIEL *et al.*, 1999). La pepsine garde la majorité de son activité pendant 24 heures à 37°C et une semaine à 4°C (DONTA et VAN VUKIS, 1970). La pepsine de poulet est plus protéolytique et moins stable à la chaleur que la chymosine (GORDIN et ROSENTHAL, 1978).



**Figure n° 01 :** (A) Appareil digestif du poulet ; (B) Complexe stomacal du poulet ; (C) Anatomie du complexe stomacal des Galliacées (LARBIER et LECLERCQ, 1992).

En 1973 - 1974, 50% des fromages en Israël sont fabriqués par la pepsine de poulet (RODNEY *et al.*, 1988). Elle permet la fabrication de fromage cheddar si sa maturation ne dépasse pas trois mois (FINDLAY *et al.*, 1984). GREEN *et al.*, (1984) l'ont utilisé en mélange avec la pepsine porcine pour la fabrication de fromage Cheddar. PAEZ DE LEON *et*

*al.*, (1995) l'ont utilisé dans la production de fromage pasteurisé. STANLEY *et al.*, (1980) ; GREEN *et al.*, (1984) ; FINDLAY *et al.*, (1984) ont signalés que la texture du fromage Cheddar obtenu par la pepsine de poulet manquait de fermeté et a développé un goût amère après trois mois de fabrication. Ils ont également signalés, que les rendements fromagère été plus faible que ceux de la chymosine.

### **I.2.3. Succédanés d'origine végétale**

#### **I.2.3.1. Généralités sur les enzymes d'origine végétale**

La coagulation du lait peut venir des pratiques que l'on retrouve dans le monde entier, par l'emploi, non pas d'acide lactique ou d'enzymes animales, mais d'extraits végétaux (FROC, 2001). De très nombreuse préparation coagulante sont issues du règne végétal (ECK et GILLIS, 1997). Ces protéases sont réparties en groupes basés sur le mécanisme catalytique utilisé pendant le processus hydrolytique. Les principaux types catalytiques sont aspartate, sérine, cystéine et métalloprotéases (BAH *et al.*, 2006). Les protéases végétales coagulantes appartiennent aux trois premiers groupes (BRUNO *et al.*, 2006).

L'Espagne et le Portugal ont la plus grande production de variété de fromages en utilisant l'extrait de *Cynara* comme agent coagulant (ROSEIRO *et al.*, 2003). Ces extraits sont utilisé dans la fabrication des fromages portugais Serra et Serpa (MACEDO *et al.*, 1993) et l'Espagnol de Los Pedroches et La Serena (ROA *et al.*, 1999) et Tortadel Casar ainsi que le fromage Los Ibores et le fromage Flor de Guía (FERNANDEZ-SALGUERO *et al.*, 1991, 1999 ; SANJUAN *et al.*, 2002). Dans certains pays d'Afrique comme le Nigéria et la République du Bénin, les extraits de *Calotropis procera* (pomme de Sodome) sont utilisés dans la fabrication de fromage Peulh (ROSEIRO *et al.*, 2003). Dans les régions chaudes plusieurs plantes renferment des principes coagulants telle que la ficine provenant de latex du figuier, la papaïne issu de papayer et la bromelaine issu du l'ananas (ECK et GILLIS, 1997). Toutefois, la nature protéolytique excessive de la plupart des coagulants végétales a limitée leur utilisation dans la fabrication des fromages en raison de rendement fromagère réduit et des défauts de saveur et de texture (LO PIERO *et al.*, 2002).

#### **I.2.3.2. Cas de l'extrait de ficine**

##### **I.2.3.2.1. Généralités sur le figuier**

Le figuier dont le nom botanique *Ficus carica L.*, est un arbre à feuilles caduques de la famille des Moraceae qui comprend environ 1500 espèces classées en 52 genres dont le genre

figus (VIDAUD, 1997 ; SOLOMON *et al.*, 2006 ; RAMEAU *et al.*, 2008 ; NICOTRA *et al.*, 2010 ; MAWA *et al.*, 2013). Du point de vue systématique, la classification botanique du figuier comme décrite par GAUSSEN *et al.*, (1982) ; BABY et RAJ, (2011) est la suivante :

Règne	Végétal
Embranchement	Phanérogames
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Hamamélidées
Série	Apétales unisexuées
Ordre	urticales
Famille	<i>Moracées</i>
Genre	<i>Ficus</i>
Espèce	<i>Ficus carica L.</i>

L'origine de figuier n'est pas déterminé. Selon VIDAUD (1987), le figuier est originaire de bassin méditerranéen et du moyen orient. VILMORIN, (2003) rapporte qu'il est originaire d'Asie occidentale, d'Afrique de nord ou des Canaries. Selon FOREST *et al.*, (2003) il serait originaire d'Hawaï. Selon MAWA *et al.*, (2013) il est originaire du Sud-ouest d'Asie et de la Méditerranée.

Le figuier est une espèce de grande importance commerciale (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Il est cultivé surtout pour ses fruits qui sont une excellente source de minéraux, de vitamines, de fibres alimentaires et d'acides aminés (VEBERIC *et al.*, 2008 ; SOLOMON *et al.*, 2006). Traditionnellement, les figues sont utilisées pour leurs vertus médicinales comme remèdes laxatifs, cardiovasculaires, respiratoires et anti-inflammatoire (GUARRERA, 2005, BABY et RAJ, 2011).



**Figure n° 02 :** photo d'un figuier

#### **I.2.3.2.2. Le latex**

Le latex est un liquide visqueux de couleur blanche, il est largement distribué dans la plante (KIM *et al.*, 2003). Ce matériel contient divers métabolites secondaires comme les composés phénoliques et des protéines à savoir les protéases à cystéine (AGRAWAL et KONNO, 2004). Le latex est constitué de caoutchouc, résine, albumine, sucre et acide malique, enzymes protéolytiques, diastase, estérase, lipase, catalase et peroxydase (BABY et RAJ, 2011). Traditionnellement, il est utilisé dans le traitement de la goutte, des ulcères et des verrues (LANSKY, 2008 ; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Il contient une enzyme protéolytique capable de coagulation de lait et de digérer la caséine (DEVARAJ *et al.*, 2008).

#### **I.2.3.2.3. Localisation et caractéristiques de la ficine (ficain) (EC 3.4.22.3)**

Il est connu depuis bien d'années que le latex contient une activité protéolytique. Le nom ficine a été inventée par ROBBINS (1930) pour la poudre blanche purifiée dotée d'une activité antihelminthique obtenu à partir de latex de genre *Ficus* (SINGLETON *et al.*, 2013).

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 (LOWE, 1976 ; NASSAR *et al.*, 1987 ; GRZONKA *et al.*, 2007 ; NOUANI *et al.*, 2009 ; PAYNE, 2009 ; DEVARAJ *et al.*, 2008, 2011 ; AZARKAN *et al.*, 2011 ; ZARE *et al.*, 2013 ; SHAH *et al.*, 2014). Les informations disponibles indiquent que la ficine a beaucoup de propriétés communes avec la papaïne (DEVARAJ *et al.*, 2011).

Le poids moléculaire de la ficine purifiée est compris entre 20 et 35 KDa. Selon DEVARAJ *et al.*, (2008, 2011) il s'agit d'une seule chaîne polypeptidique ayant un poids moléculaire de 23,1 KDa. PAYNE (2009) estime que sa masse moléculaire est comprise entre 25 et 26 KDa. LAWE (1976) et KATSAROS *et al.*, (2008) ont évalués son poids moléculaire à 25 KDa. Selon DEVARAJ *et al.*, (2008) la ficine est composée de 210 résidus d'acides aminés. Son site actif est constitué de deux acides aminés qui sont la cystéine (Cys-25) et l'histidine (His-159) (KATSAROS *et al.*, 2008 ; FEIJOO-SIOTA *et al.*, 2011). Cette enzyme intervient sur la protéine au niveau de résidus d'acide aminé tyrosine et phénylalanine (DICTIONARY OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, (2009) ; PAYNE, (2009) ; WHITEHURST *et al.*, 2010) .

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'élution (AZARKANE *et al.*,

2011 ; DEVARAJ *et al.*, 2008). L'autolyse de la ficine peu donné des peptides qui ont des poids moléculaires compris entre 14 et 18 KDa (AZARKANE *et al.*, 2011). ZARE *et al.*, (2013) ont signalé la présence de 4 isoformes (A, B, C et D).

La ficine présente une grande stabilité thermique. Sa température d'activité est comprise entre 67 et 77°C (NASSAR *et al.*, 1987). Elle est de 60°C selon FADYLOGLU, (2001). GRZONKA *et al.*, (2007) ont reportés des température de 45 à 55 °C. FEIJOO-SIOTA *et al.*, (2011) et BEKHI *et al.*, (2013) l'ont évaluée à 65°C. Selon PAYNE (2009) et NOUANI *et al.*, (2009) elle est de 82°C. L'activité maximale de la ficine est obtenue dans une gamme de pH de 5 à 8,5. FADYLOGLU, (2001) a évalué le pH optimal de coagulation à 5. GRZONKA *et al.*, (2007) ont signalé qu'elle est très active dans la gamme de pH de 5 à 8. Selon DEVARAJ *et al.*, (2011) et FEIJOO-SIOTA *et al.*, (2011) elle est active à des valeurs de pH compris entre 6.5 et 8.5. Cependant, PAYNE (2009) a obtenu une activité maximale dans la zone de pH 5 à 7.

#### **I.2.3.2.4. 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 (FADYLOGLU, 2001; FEIJOO-SIOTA *et al.*, 2011 ; NOUANI *et al.*, 2009 ; SHAH *et al.*, 2014).). Dans le secteur de la brasserie afin d'obtenir de bonnes propriétés colloïdales à de basses températures (JONES, 2005). Ou dans le domaine pharmaceutique (FEIJOO-SIOTA *et al.*, 2011 ; AZARKANE *et al.*, 2011). La ficine est aussi utilisée pour l'attendrissement de la viande (GRZONKA *et al.*, 2007 ; PAYNE, 2009). En Italie, la ficine est utilisée pour la fabrication d'un fromage traditionnelle le Cacioricotta (FACCIA *et al.*, 2012). 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 (ficine brute) est utilisé comme agent coagulant pour la préparation d'un fromage connu sous le nom *AGUGLI* ou *IGUISSI* selon la région.

## **II. Le lait**

### **II.1. Dénomination légale du lait cru**

Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompu d'une femelle laitière bien portante bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum. Telle est la définition adapté par le premier congrès international pour la répression des fraudes alimentaires tenue à Genève en 1908 (VEISSEYRE, 1979). La

dénomination "lait" sans indication de l'espèce animale de provenance est réservée au lait de vache. Tout lait d'une femelle laitière autre que la vache doit être désigné par la dénomination lait suivie de l'indication de l'espèce animale dont il provient (J.O.R.A. N° 69, 2003).

## **II.2. Composition chimique globale de lait**

En général, les constituants principaux du lait sont l'eau, le lactose, les protéines, les graisses et sels ou cendre; également, le lait contient des constituants mineurs tels que les vitamines et les enzymes (HUPPERTZ *et al.*, 2006). Les constituants majeurs du lait de vache sont présentés dans le tableau 01.

**Tableau n° 01** : Composition générale du lait de vache (FILION, 2006)

<b>Constituants</b>	<b>Teneur du lait en ses constituants en g/l</b>
Constituants minéraux	
• Eau	902,0
• Constituants salins minéraux	6,9
• Gaz dissous	0,1
Constituants organiques	
• Constituants salin	01,7
• Lactose	49,0
• Matière grasse	38,0
Protéique, ou constituants azoté	
• Protéique	32
• Caséine	26
• Protéines dites solubles	06
Constituants azotés non protéiques	1,5

### **II.2.1. Eau**

L'eau représente environ 87 à 88% du poids total du lait. Elle se trouve sous deux formes, l'eau libre (96%) et l'eau liée (4%) (LUQUET, 1985).

### **II.2.2. Matière grasse**

La matière grasse (MG) est présente dans le lait sous forme de globules gras de dimension de 0,1 à 10 µm. Essentiellement constitué de triglycérides (98%), phospholipides (1%) et d'une fraction insaponifiable (1%) constituée en grande partie de cholestérol et de β-carotène. Elle est



constituée de 65% d'acides saturés et de 35% d'acide gras insaturés (3% d'acides gras (AG) polyinsaturés) (VIGNOLA, 2002).

### **II.2.3. Vitamines**

Le lait ne permet pas de satisfaire tous les besoins vitaminiques. Ce sont surtout les vitamines A, B1 et B2 qui constituent la valeur nutritive du lait (HUPPERTZ *et al.*, 2006).

### **II.2.4. Glucides**

Le sucre le plus abondant du lait est le lactose. C'est le constituant majeur de la matière sèche du lait (environ 40%). C'est un disaccharide (LUQUET et BONJEAN-LINCZOWSKI, 1986 ; DEBRY, 2001 ; FREDOT, 2005). On peut retrouver d'autres glucides en faibles quantité tel que le glucose et le galactose qui provient de l'hydrolyse du lactose (VIGNOLA, 2002). Il joue un rôle important, car il est fermenté lors de fabrication de divers produits laitiers (MAHAUT *et al.*, 2000).

### **II.2.5. Matières minérales**

La quantité des minéraux contenue dans le lait après incinération varie de 0,60 à 0,90% (VIGNOLA, 2002). Les principaux sont le potassium, le calcium, le chlore, le phosphore, le magnésium, et le sodium. On note également la présence des oligo-éléments (ALIAS, 1974 ; HUPPERTZ *et al.*, 2006 ; JEANTET *et al.*, 2008). Ils se trouvent sous deux formes principales, surtout sous forme de sels ionisés et solubles dans le sérum et sous forme micellaire. Les éléments basiques majeurs (Ca, K, Mg et Na) forment des sels avec les constituants acides qui sont les protéines, les citrates, les phosphates et les chlorures (VIGNOLA, 2002 ; MAHAUT *et al.*, 2003).

### **II.2.6. Matières azotées**

On distingue deux groupes de matières azotées dans le lait : la matière azotée protéique et la matière azotée non protéique.

#### **II.2.6.1. Azote non protéique (ANP)**

L'azote non protéique représente en moyenne 5% de l'azote total du lait et se présente sous forme d'urée, créatine, créatinine, ammoniacque, acides aminés libres, vitamines et nucléotides. (LUQUET et BONJEAN-LINCZOWSKI, 1986 ; MAHAUT *et al.*, 2003).

#### **II.2.6.2. Azote protéique**

Technologiquement, les protéines du lait sont probablement les constituants les plus importants du lait. La recherche sur des protéines du lait remonte au début du 19<sup>ème</sup> siècle. Ils

sont probablement les mieux caractérisées de toutes les protéines alimentaires. Les protéines du lait peuvent être divisées en deux classes selon leur solubilité à pH 4,6, les protéines insolubles à pH 4,6 s'appellent les caséines et les protéines solubles à pH 4,6 sont les protéines de sérum ou les protéines de petit lait (FOX, 2003 ; HUPPERTZ *et al.*, 2006).

#### II.2.6.2.1. Les protéines de sérum

Les protéines de sérum représentent environ 20% des protéines totales. Elle se trouve sous forme de solution colloïdale. Les deux principales sont  $\beta$ -lactoglobuline et  $\alpha$ -lactoglobuline, les autres protéines du sérum sont des immunoglobulines, le sérum albumine bovine (SAB) et la lactoferrine. En plus de ces protéines, des enzymes sont présentes dans le sérum (WALSTRA *et al.*, 1999 ; VIGNOLA, 2002 ; HUPPERTZ *et al.*, 2006). Le tableau 02 résume la composition protéique de lactosérum de quelques espèces animales.

**Tableau n° 02** : proportions relatives des protéines de sérum (g/100g des protéines totales du sérum) de quelques mammifères (HUPPERTZ *et al.*, 2006).

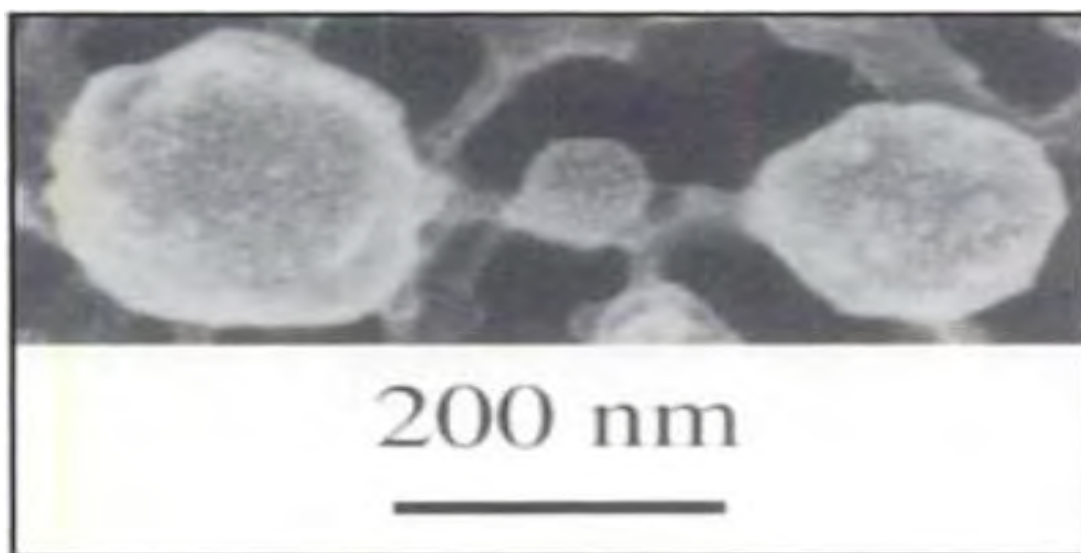
	<b>Bovine</b>	<b>Ovine</b>	<b>Caprine</b>
$\beta$ -Lactoglobulin	50	51	39
Albumins	25	25	40
Protease peptone	13	06	09
Immunoglobulines	12	18	12

#### II.2.6.2.2. Les caséines

Les caséines représentent 80% des protéines totales du lait et se composent de quatre protéines majeures, les caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ , et la caséine- $\kappa$ . Leur point isoélectrique est de 4,65 (BRULE *et al.*, 1997 ; JEANTET *et al.*; 2008). Il existe également une caséine  $\gamma$  qui est formée par l'hydrolyse de la caséine  $\beta$  par le plasmide. Les micelles de caséines sont constituées de 92% de protéines et de 8% de minéraux (VIGNOLA, 2002). Il existe plusieurs variantes génétiques pour les caséines et leur fréquence est plus ou moins importante selon les espèces (GROSCLAUDE, 1988).

Les caséines sont une classe des phosphoprotéines, dont les propriétés diffèrent considérablement de la plupart des autres protéines. Elles sont hydrophobes et ont une charge relativement élevée et contiennent beaucoup de la proline et peu de résidus de cystéine (HUPPERTZ *et al.*, 2006). Ces protéines possèdent un certain nombre de caractères communs, la présence de phosphore sous forme de groupements phosphoséryles, leur richesse

en certains acides aminés (glu, leu, pro) et la forte proportion de résidus apolaires (MAHAUT *et al.*, 2000). Le diamètre moyen généralement admis est voisin de 180 nm avec une distribution entre 100 et 500 nm (CAYOT et LORIENT, 1998). On estime que la masse micellaire est comprise entre 0,5 et  $1 \times 10^9$  Da. La forme est considérée comme sphérique mais avec une surface granuleuse la faisant ressembler à une framboise (SCHMIDT, 1982 ; WALSTRA, 1999). La figure 03 représente une micelle de caséine.



**Figure n° 03** : micelle de caséine vue par un microscope électronique (CAYOT et LORIENT, 1998, VIGNOLA, 2002).

A la différence des protéines solubles qui ont une structure globulaire compacte, les caséines présentent une structure lâche et peu ordonnée ce qui les rend accessible aux enzymes protéolytiques (SCHMIDT, 1982). Leur constitution diffère entre le centre et la périphérie, les caséines  $\beta$  et  $\alpha_{s1}$  sont plus présentes au centre de la micelle et forment le cœur hydrophobe, tandis que la partie externe de la micelle est formée de caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  et  $\kappa$  (VIGNOLA, 2002).

La caséine  $\kappa$  est la seule à présenter des résidus glycosylés liés essentiellement au niveau des résidus thréonine situés dans la partie C-terminale de la protéine. Cette dernière forme une chevelure hydrophile, chargée négativement à la surface de la micelle ce qui augmente sa stabilité (WALSTRA, 1990). De plus, la caséine  $\kappa$  présente une très grande sensibilité à l'action de la chymosine au niveau de la liaison Phe105-Met106 conduisant à la libération du glycomacropéptide et de paracaséine  $\kappa$  (MAHAUT *et al.*, 2000, VIERLING, 2003). La figure 04 présente la structure de la micelle de caséine

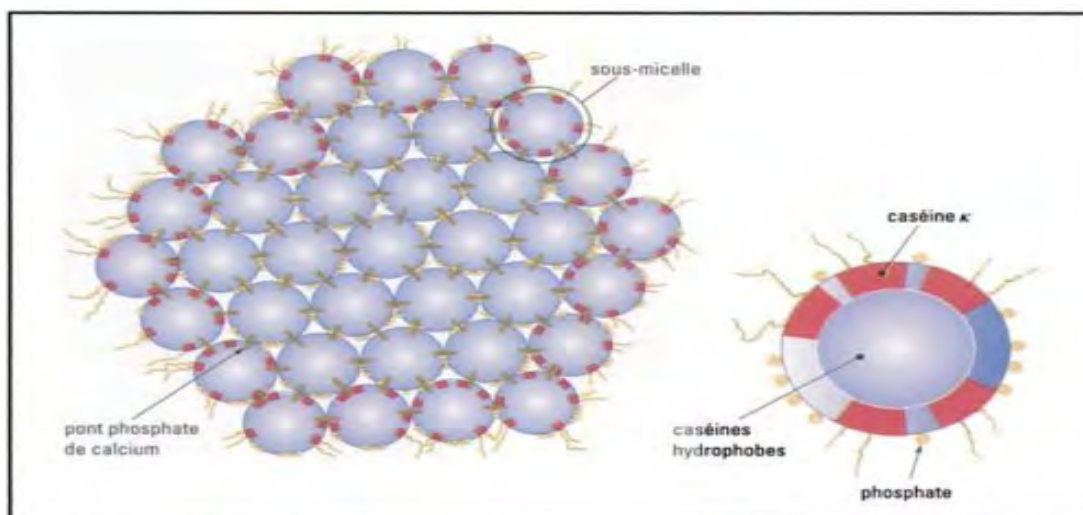


Figure 04 : Structure de la micelle de caséine (WAUGH *et al.*, 1970 ; AMIOT *et al.*, 2002 ; WALSTRA, 1999)

### III. Mécanismes de coagulation

La coagulation du lait avec la présure est la première étape dans la production des fromages (MEHMET Ak, 2003 ; HUPPERTZ *et al.*, 2006). La transformation du lait en fromage comporte trois étapes principales : la coagulation, l'égouttage et l'affinage. La coagulation correspond à une déstabilisation des micelles de caséines. elle peut être provoquer par acidification, par l'action d'une enzyme ou par l'action combinée des deux (VIGNOLA, 2002, HUPPERTZ *et al.*, 2006). Le tableau 03, résume les différences entre les caillés obtenus par coagulation acide et par coagulation enzymatique.

**Tableau n° 03** : comparaison entre un caillé lactique et un caillé présure (VIGNOLA, 2002).

Paramètres	Type de caillés	
	Lactique	Présure
Egouttage	Faible	Elevé
Teneur en eau	Elevé	Faible
Teneur minérale	Faible	Elevé
Pouvoir tampon	Faible	Elevé
Teneur résiduelle en lactose	Elevé	Faible
Structure des caséines	Etat dissocié	Etat micellaire
pH	Faible < 4,6	Elevé > 5,00
Type de texture	Plastique, fragile	Elastique, solide
Durée de conservation	Faible (quelques semaines)	Elevé (plusieurs mois)

### III.1. 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 (MAHAUT *et al.*, 2003). 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.2. Coagulation mixte

La coagulation mixte est réalisée par acidification de lait et adition enzymes coagulantes. En pratique cette méthode est utilisée pour la fabrication des fromages frais ou fromages à pâte molle (CHEFTEL et CHEFTEL, 1977 ; WIGLEY, 1996). Le coagulum obtenu présente des caractères intermédiaires entre ceux de gel lactique et présure. Il est caractérisé par une souplesse et une élasticité moins grande, une fermeté et friabilité plus accentuées que celle du gel présure (VEISSEYRE, 1975 ; JEANTET *et al.*, 2008)

### III.3. 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 (DALGLEISH, 1993; FOX *et al.*, 1996; FOX et McSWEENEY, 1997 ; MAHAUT *et al.*, 2003 ; HORNE et BANKS, 2004). La figure 05 montre les phases de coagulation enzymatique.

#### III.3.1. Phase primaire

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 caséinomaclopeptide (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 ; HUPPERTZ *et al.*, 2006).

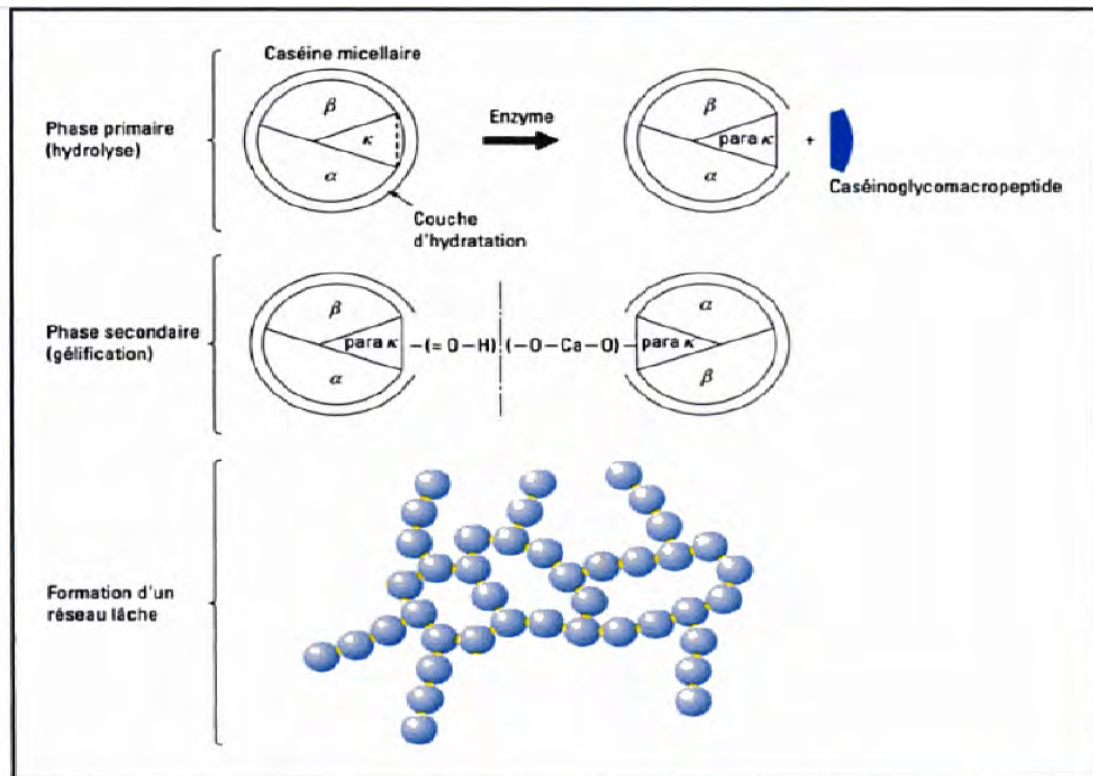


Figure n° 05 : Phases de coagulation de lait et formation de réseau (VIGNOLA, 2002).

### III.3.2. Phase secondaire

Cette phase commence dès que 85% de la caséine- $\kappa$  est hydrolysée (HUPPERTZ *et al.*, 2006). Elle est dite phase d'agglomération ou d'agrégation ou phase de coagulation proprement dit (LUCHEY, 2002). Durant laquelle la libération du macropeptide 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 macropeptides entraîne également une réduction du diamètre hydrodynamique et une perte de la stabilité (WALSTRA *et al.*, 1981 ; LUCHEY *et al.*, 2003).

La nature des interactions intervenant durant cette phase n'est pas encore bien connue (SCHMIDT, 1982, VIGNOLA, 2002). Toutefois, les ponts calciques et les forces de Van der Waals ainsi que les interactions hydrophobes semble être impliquées (SCHMIDT, 1982). Les micelles déstabilisées s'agrègent en présence des ions de calcium libres ( $Ca^{++}$ ) (LUCHEY et FOX, 1993 ; DALGLEISH et HOLT, 1988). Au début, il ya formation de chaînes linaires de micelles qui continuent de s'agréger pour former des amas. Ces derniers constituent le gel protéique qui se sépare nettement de lactosérum (LUCHEY, 2002).

### **III.3.3. Phase tertiaire**

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.*, 2000; VIGNOLA, 2002 ).

## **VI. Fabrication des fromages**

### **VI.1. Définition des fromages**

Le fromage 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 (VIGNOLA, 2002).

### **VI.2. Le fromage à pâte molle exemple « Camembert »**

#### **VI.2.1. Définition**

Le Camembert est un fromage à pâte molle, affiné en surface principalement par des moisissures. Il se présente sous la forme d'un cylindre plat ou de morceaux cylindrique. La pâte a une couleur allant du blanc cassé au jaune pâle et une texture molle mais non friable, affinée de la surface au centre (CODEX STAN, 2010). 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, 1987).

#### **VI.2.2. Technologie de fabrication du Camembert**

La transformation de lait en fromage, comporte pour la plus part trois étapes principales qui sont la coagulation, l'égouttage et l'affinage (VIGNOLA, 2002). Selon JEANTET *et al.*, (2008) la standardisation de lait précède ces étapes. ECK, (1987) a signalé le salage avant l'affinage.

##### **VI.2.2.1. 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) (VIGNOLA, 2008).

#### **VI.2.2.2. La coagulation**

La coagulation correspond aux modifications physicochimiques des micelles de caséine sous l'action d'enzymes protéolytiques et/ou d'acide lactique ce qui aboutit à la formation d'un coagulum (ECK, 1990 ; VIGNOLA, 2002 ; JEANTET *et al.*, 2008).

#### **VI.2.2.3. L'égouttage**

Cette étape consiste à éliminer de la majorité de lactosérum expulsé par synérèse, qu'il soit à l'intérieure ou à l'extérieure de gel (ECK, 1990, JEANTET *et al.*, 2008). En pratique l'égouttage comprend deux périodes, la première est l'égouttage proprement dit ou l'égouttage principal au cours de laquelle la plus part de lactosérum est éliminé, elle se situe entre la fin de la coagulation et le démoulage, la seconde est l'égouttage complémentaire, allant de démoulage à l'affinage. Il est généralement dû au salage (ECK, 1987).

#### **VI.2.2.4. Le salage**

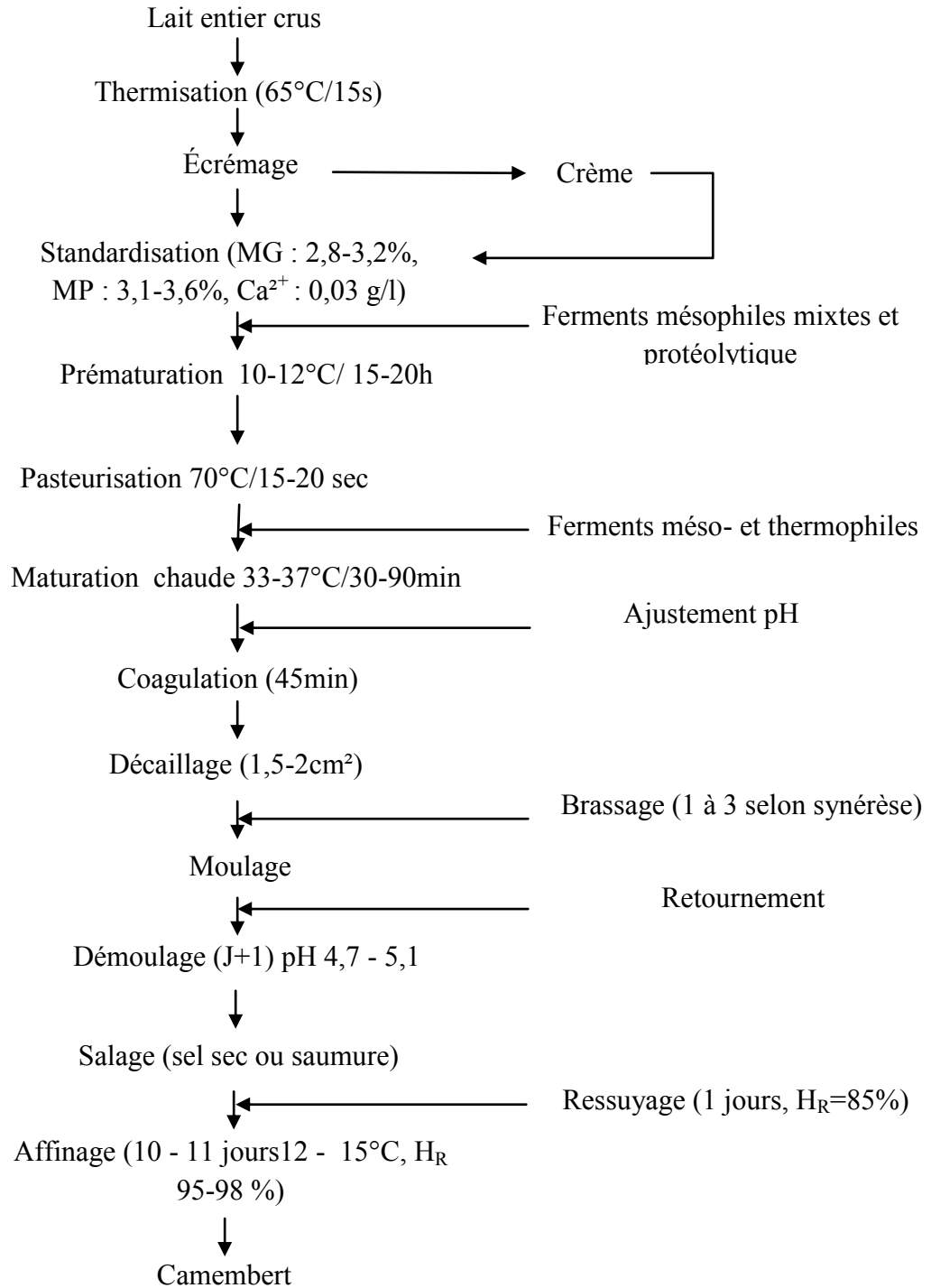
C'est une opération d'enrichissement de la pâte en chlorure de sodium (NaCl) à des doses de 1 à 2% (Eck, 1990). Le salage complète l'égouttage du fromage en favorisant le drainage du lactosérum. Il apporte ainsi le goût caractéristique du fromage et il agit sur l'activité de l'eau qui influence le développement des microorganismes (Eck, 2006).

#### **VI.2.2.5. L'affinage**

Cette étape correspond à une digestion enzymatique des constituants protéiques et lipidique du caillé (Eck, 1987 ; JEANTET *et al.*, 2008) ce qui donne aux caillés une texture et une saveur caractéristique selon le type de fromage (VIGNOLA, 2002). C'est une étape complexe à cause de la grande hétérogénéité physicochimique dans la matrice fromagère et le type d'enzymes intervenant dans cette étape qui peuvent avoir différents origines, il peut s'agir d'enzymes endogènes du lait (plasmide, lipase, etc.), ou ajoutés au lait au cours de fabrication ou produites au cours de l'affinage (MAHAUT *et al.*, 2003).

L'affinage est dominé par des phénomènes biochimiques qui sont : la fermentation du lactose résiduel et consommation de lactate, l'hydrolyse de la matière grasse et des protéines et la production d'arôme (JEANTET *et al.*, 2008). La figure 06 représente le diagramme général de fabrication de fromage à pâte molle type « Camembert ».





**Figure n° 06 :** Diagramme générale de fabrication de fromage a pâte molle type camembert (JEANTET *et al.*, 2008).

### **VI.3. Les défauts des fromages**

#### **VI.3.1. Défauts de texture**

Ils sont dus aux défauts d'égouttage. Fromage à pâte sèche où fromage est dit plâtreux. C'est le résultat d'un affinage insuffisant provoqué par un égouttage très poussé. Fromage à pâte collante, lorsque l'égouttage est insuffisant, le caillé très humide est le siège d'un développement excessif de la flore protéolytique entraînant une digestion prononcée de la caséine. Ou fromage gonflé où la pâte a l'aspect d'une éponge (VEISSEYRE, 1975 ; MAHAUT *et al.*, 2003).

#### **VI.3.2. Défauts d'aspect et de croûtage**

La présence de certains microorganismes indésirables peut entraîner des défauts de présentation et parfois une altération de la texture et de la croûte (MAHAUT *et al.*, 2003). L'accident du « bleu » caractérisé par l'apparition à la surface de taches bleuâtres ou verdâtres provoquées par *Penicillium glaucum* ou de *Penicillium requiforti* (BOTTON *et al.*, 1990 ; MAHAUT *et al.*, 2003). « Graisse » ou « Peau de crapaud », l'agent responsable de ce défaut est *Géotrichom candidum* qui fait partie de la flore normale de nombreux fromages (pâte molle), son développement peut devenir trop important lorsque la température de l'égouttage est trop élevée et le salage est insuffisant. La surface du fromage devient glaiseuse et jaunâtre avec une fente de protéolyse (DESFLEURS, 1980 ; MAHAUT *et al.*, 2000, 2003).

#### **VI.3.3. Défauts de saveur et d'arôme**

Goût d'amertume, est un défaut de saveur relativement fréquent dans divers types de fromage notamment les pâtes molles. Le défaut peut avoir plusieurs origines, mais il est le plus souvent dû à l'accumulation de peptides de petites tailles qui proviennent de la protéolyse. La formation des peptides amers dans les fromages au cours de la maturation est inévitable (BARS-BAILLY *et al.*, 1979; MAHAUT *et al.*, 2003 ;ECK, 2006). Goût de rance, apparaît lorsqu'il y a une lipolyse excessive donnant naissance à une quantité élevée d'acides gras libres à chaînes courtes et moyenne (C4 et C12) (MOLLIMARD *et al.*, 1997; MAHAUT *et al.*, 2003).

*Matériel et  
méthodes*

## **I.1. Matières premières**

### **I.1.1. Le lait**

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

Il est reconstitué par dissolution de 12g de poudre de lait écrémé dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01M. Il est appelé substrat standard de Berridge (BERRIDGE, 1955. LIBOUGA D.G, 2008 ; BENYAHIA-KRID *et al.*, 2010). L'azide de sodium (0,04% p/v) est ajouté pour éviter le développement des microorganismes. Le substrat standard de Berridge est conservé à 4°C pendant 12 h pour de permettre l'équilibre physico-chimique.

La poudre du lait utilisée provient du même lot et conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

### **I.1.2. La présure**

La présure utilisée est une présure commerciale présentée sous forme de poudre (Rhodia food, Marshall TM, France) de force 1/100.000 à 520 mg de chymosine /1 g de présure. La poudre de présure est conservée à 4°C. A partir de celle-ci, nous avons préparé une solution mère par reconstitution à 1 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée. Cette solution est conservée à 4°C durant 3 jours maximum. Lors de chaque utilisation nous avons procédé à des dilutions dans de l'eau distillée à partir de la solution mère d'une façon à avoir un temps de floculation à 30°C compris entre 12 et 15 min.

### **I.1.3. La ficine**

#### **I.1.3.1. Récupération du latex**

La matière première végétale utilisée dans cette étude est le latex du figuier (*Ficus carica L.*) qui est le liquide blanc visqueux qui s'échappe des feuilles et des fruits quand ils sont séparés des tiges ou quand les jeunes tiges sont cassées. Le latex est récupéré durant la période qui s'étale de la fin de mois de mai jusqu'au mois de septembre dans la région de Tizi Ougeni, Adekar (Wilaya de Bejaia), la variété de figuier visée est « Melloui».

Dans le but de caractériser l'extrait brut coagulant du figuier, le latex est récupéré dans des flacons propres et protégé de l'air pour prévenir l'oxydation des constituants ainsi que la prise en masse des gommages de latex. Après que les fruits ou les feuilles sont arrachées ou les

jeune rameaux cassés, deux à trois gouttes de latex s'échappent et sont directement récupérées dans un flacon propre conservé au réfrigérateur (4 à 8°C) jusqu'à extraction de système enzymatique. Le volume total de latex récupéré pour cette étude est d'environ 200 ml.

### **I.1.3.2. Extraction de la ficine**

Le latex est soumis à une centrifugation de 3200 g pendant 15 min à une température de 4°C, pour l'élimination de la gomme (RIFAAT *et al.*, 1970; MAMORU S. *et al.*, 1974 ; ONER et AKAR., 1993 ; FADYLOGLU, 2001 ; LOW *et al.*, 2006 ; NOUANI *et al.*, 2009). Le surnageant, qui contient l'extrait brut de l'enzyme, est ajusté à pH 5 par utilisation de l'acide chlorhydrique à une concentration de 2M et maintenu à -18° C jusqu'à utilisation.

### **I.1.4. La pepsine**

#### **I.1.4.1. Préparation des proventricules de poulet**

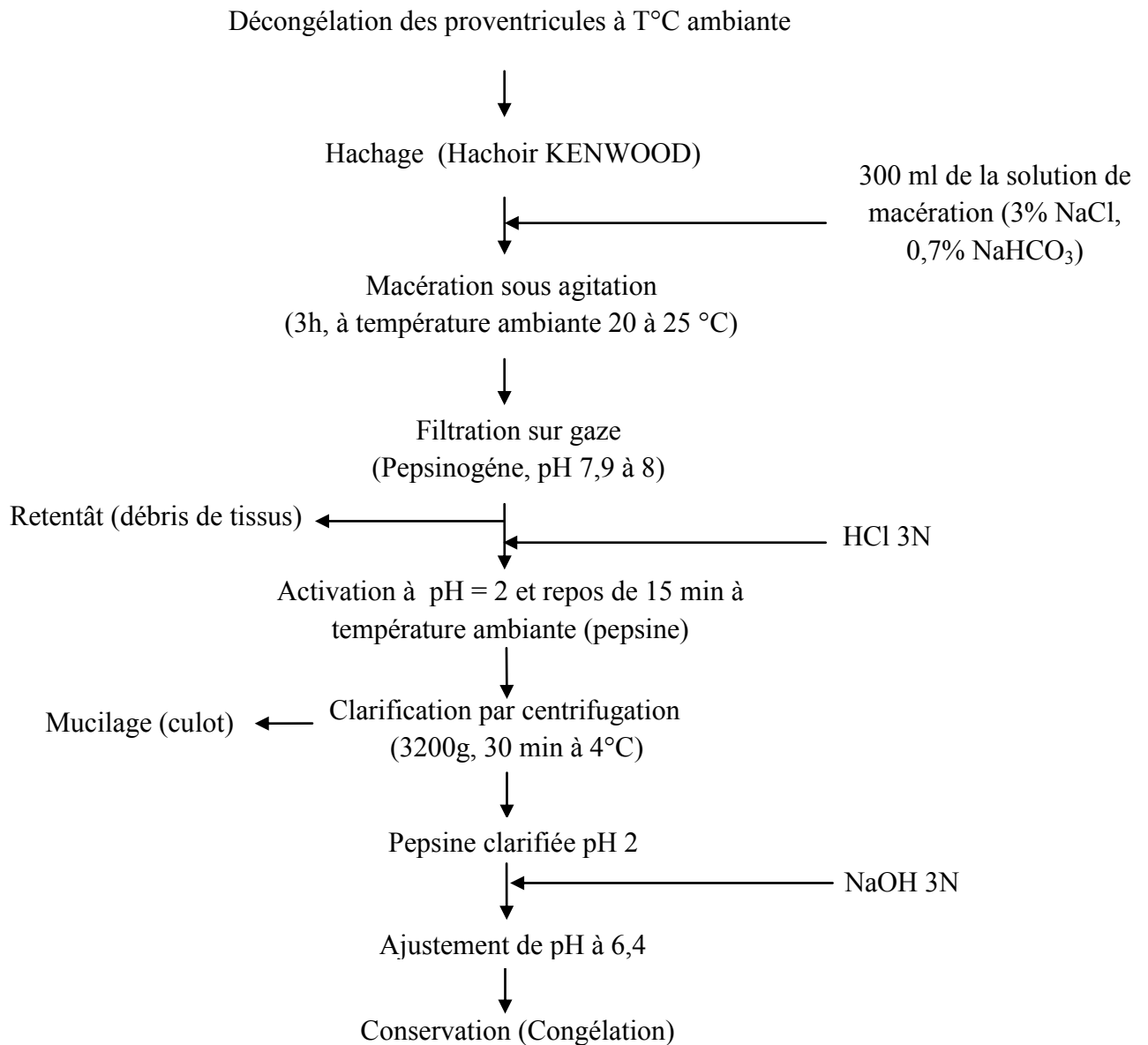
Les proventricules utilisés ont été récupérés de l'abattoir « El-nour » situé dans la région El-Menia (Constantine). Après abattage, déplumage et éviscération, les proventricules sont séparés du tube digestif de poulet, débarrassés de la matière grasse qui les entoure, puis transportés dans une glacière. Au laboratoire, les proventricules, sont ouverts par incision longitudinale et vidés de particules alimentaires adhérentes aux parois. Après lavage et égouttage, ils sont repartis en lots de 100g environ, emballés dans des feuilles d'aluminium puis conservés au congélateur (environ - 18°C) jusqu'à utilisation.

#### **I.1.4.2. Extraction de la pepsine de poulet**

L'extraction de la pepsine est réalisée en suivant le protocole d'extraction proposé par BOHAK, (1970) cité par BENYAHIA-KRID *et al.*, (2010) et NOUANI *et al.*, (2011), les principales étapes sont présentées en figure 07.

Les proventricules décongelés, sont hachés à l'aide d'un hachoir ménager à couteaux (KENWOOD). Les proventricules hachés sont versés dans une solution saline de macération (30 g/l de NaCl et 7 g/l de NaHCO<sub>3</sub>), à raison de 300 ml de la solution de macération pour 100 g des proventricules hachés (VALLES et FURET, 1977 ; BENYAHIA-KRID *et al.*, 2010 ; NOUANI *et al.*, 2011).

Après 3 Heures de macération sous agitation, le pepsinogène est activé par acidification à l'aide d'une solution d'HCl 3N jusqu'à pH = 2 (GLICK *et al.*, 1989).



**Figure n° 07:** Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet selon BOHAK (1970).

Le mélange est maintenu à température ambiante pendant 15 minutes, pour faciliter l'élimination ultérieure de mucilages en provoquant leur floculation; ce qui facilitera la clarification. Ce mélange qui représente l'extrait brut de pepsine de poulet, est filtré sur une gaze et le retentât est éliminé, le filtrat est enfin centrifugé à une force centrifuge de 3200g pendant 30 min à 4°C dans une centrifugeuse (SEGMA model 3-30K, Allemagne). Le surnageant obtenu, représentant l'extrait d'enzyme clarifié est récupéré, puis ajusté à pH 6,4 par une solution de NaOH 3N et conservé à - 18 °C (congélation) jusqu'à utilisation. Le culot qui représente le mucilage et les débris des tissus est éliminé.

## I.2. Caractérisation du lait

### I.2.1. Détermination du pH de lait reconstitué (substrat de Berridge) (AFNOR 1993)

Le pH représente l'acidité de lait à un moment donné et nous renseigne sur l'état de fraîcheur du lait, c'est une mesure de l'activité des ions H<sup>+</sup> dans une solution dont le but est de déterminer quantitativement l'acidité ou la basicité de celle-ci.

#### ➤ Mode opératoire

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 l'échantillon de lait. Cet appareil doit être étalonné avec deux solutions tampons à pH 7 et 4 (HANNA instruments, Roumanie).

#### ➤ Expression des résultats

La valeur de pH s'affiche sur l'écran de l'appareil, la mesure est réalisée avant chaque utilisation de lait.

### I.2.2. Détermination de l'acidité titrable

L'acidité titrable exprime le nombre de grammes d'acide lactique présent dans un litre de lait. Elle consiste en une neutralisation par la soude (N/9) des composants acides du lait en présence d'un indicateur coloré qui est la phénolphtaléine. L'unité conventionnelle de l'acidité est le degré dornic ou 1°D représente 0,1 g d'acide lactique par litre de lait (AFNOR 1993).

#### ➤ Mode opératoire

Introduction de 10 ml de lait reconstitué dans un bécher, ajout de 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine puis titration avec la soude (NaOH 0,1N) jusqu'à apparition de la coloration rose pâle qui persistera pendant 10 secondes. Détermination du volume de NaOH utilisé pour la neutralisation.

#### ➤ Expression des résultats

L'acidité est exprimée en gramme d'acide lactique par litre de lait, selon la formule suivante : **acidité = 10 (V/V<sub>1</sub>) 0,9**

V : volume de soude utilisée ;

V<sub>1</sub> : volume de la prise d'essai.

### II.2.3. Extrait sec total (EST)

La matière sèche est le produit résultant de séchage par un humidimètre infrarouge (SARTORIUS AG, Cottinen, Allemagne) de 1 ml du lait à une température de 105 °C jusqu'à poids constant. Elle est exprimée en pourcentage de matière sèche pour 1 ml de lait reconstitué ou pour 1 g de poudre de lait.

#### ➤ Mode opératoire

Placer la capsule en aluminium sur la balance qui se trouve à l'intérieur de la chambre chaude du dessiccateur. Déposer 3 ml de substrat de Berridge (3 g pour la poudre de lait) et bien étaler à l'aide d'une spatule. La dessiccation démarre juste après fermeture du couvercle.

#### ➤ Lecture

L'appareil affichera le résultat en pourcentage d'humidité. La mesure est réalisée trois fois et le résultat est présenté sous forme d'une moyenne avec un écart type.

## I.3. Caractérisation de l'extrait enzymatique

### I.3.1. Teneur en protéines

La teneur en protéines de l'extrait enzymatique brut est déterminée selon la méthode classique de LOWRY *et al.*, (1951). Cette méthode est basée sur un procédé en deux étapes, la première est la réduction de cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$ ) par les protéines dans une solution alcaline, la deuxième est la réaction au réactif de Folin-Ciocalteu ce dernier, à base de phosphomolybdates et de phosphotungstates réagit avec les acides aminés tyrosine et tryptophane et à moindre degré avec la cystéine et l'histidine pour donner une coloration bleu caractéristique avec des maximum d'absorbance à 750 nm (NOBLE et BAILY, 2009)

#### ➤ Réactifs et solutions

- Solution (A): solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhydre à 2 % (P/V) dans Na OH à 0,1 N.
- Solution (B): 2 ml de  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à 0,5 % + 2 ml de tartrate de Na + K à 1 %. (Solution stable une journée).
- Solution (C): 50 ml (A) + 1 ml (B).
- Solution (D): réactif de Folin-Ciocalteu commercial dilué à 1/2 dans de l'eau distillée.



### ➤ Protocole expérimental

Pour 200 µl de l'extrait enzymatique dilué, 1ml de la solution réactive (C) est ajouté, homogénéisé immédiatement avec un vortex (VELP SCIENTIFICA, Europe). Après 10 minutes de repos à l'obscurité et à température ambiante, 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/2 dans de l'eau distillée est ajouté; après agitation on laisse incuber 30 minutes à l'obscurité ; l'absorbance est par la suite mesurée au spectrophotomètre (SECOMAM, Prim, France) à 750 nm.

Pour déterminer la quantité des protéines totales contenues dans l'extrait enzymatique des solutions de sérum albumine bovine (SAB) de concentration variant entre 0 et 200 µg/ml ont été utilisée pour la courbe d'étalonnage (figure 08 A). Pour mesurer son activité protéolytique (dosage des produits d'hydrolyse) la courbe d'étalonnage est tracée par utilisation de concentrations variant entre 0 à 100 µg/ml de tyrosine (figure 08 C). Une courbe d'étalonnage est tracée en utilisant la caséine à des concentrations variant de 0 à 100 µg/ml pour le dosage des protéines dans l'étude des interactions impliquées dans la formation de différents gels et le taux de protéines dans les fromages (figure 08 B).

### I.3.2. Activité coagulante

L'activité coagulante s'exprime par la rapidité avec laquelle l'enzyme coagule le lait ; elle est déterminée par mesure du temps de floculation selon la méthode de BERRIDGE (LIBOUGA *et al.*, 2006). Le temps de floculation est l'intervalle de temps compris entre l'addition de l'extrait enzymatique et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu.

L'unité d'activité coagulante (U.A.C.) ou l'unité présure est défini par la quantité d'enzyme contenue dans 1ml de la solution enzymatique qui peut coaguler 10 ml de lait (substrat standard de Berridge : 12% p/v de lait écrémé en poudre dissout dans une solution de CaCl<sub>2</sub> 0.01M) en 100 sec à 30°C (ALAIS, 1974 ; RAMET, 1997). L'activité coagulante est calculée par la formule suivante :

$$A.C. = \frac{10 \times V}{T \times V'}$$

Où : V: volume du lait ;

V': volume de l'extrait enzymatique ;

T : temps de floculation.

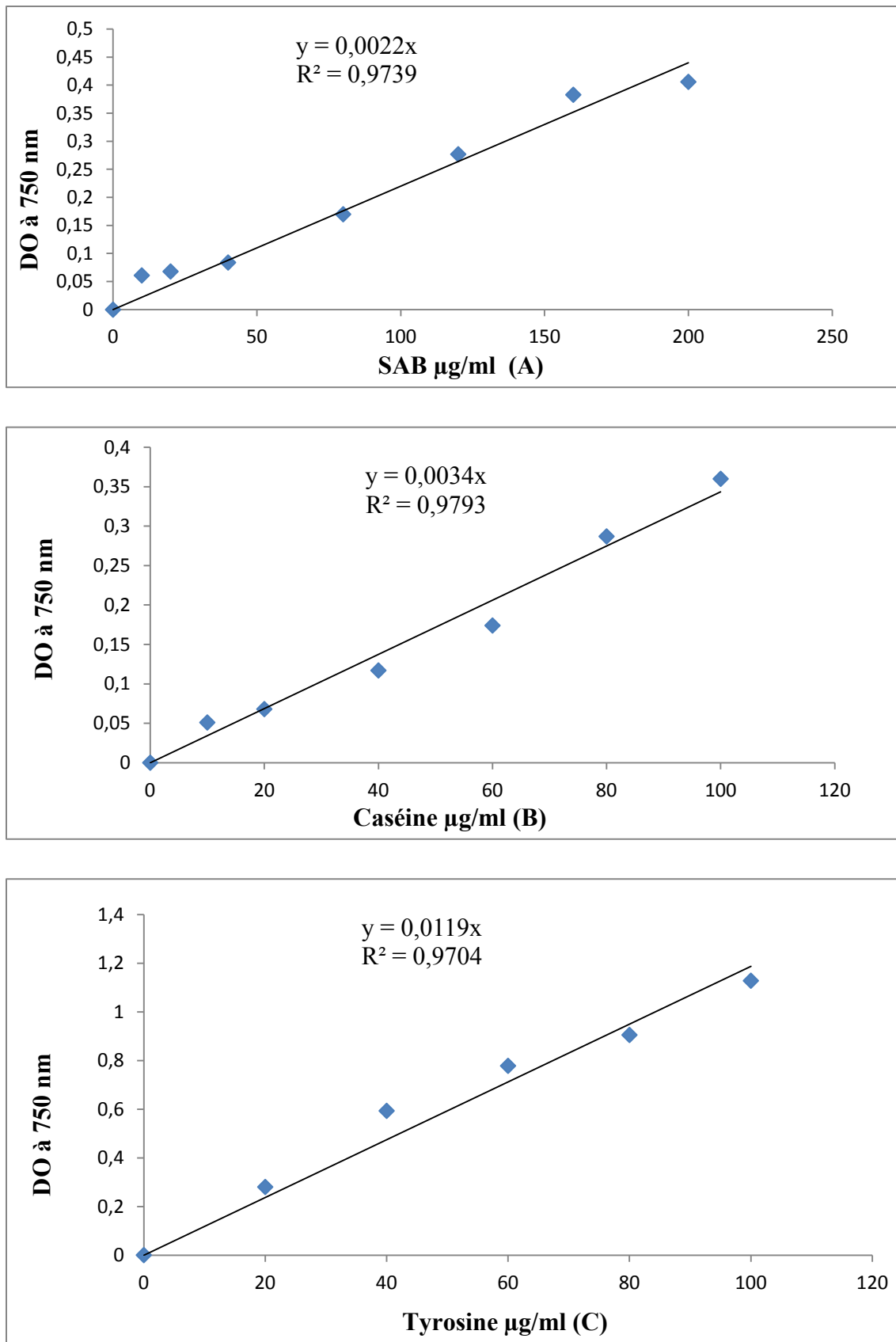


Figure n° 08 : Courbes étalons obtenues avec : A : BSA ; B : Caséine et C : Tyrosine.

Le procédé consiste à ajouter 1 ml d'extraits enzymatique à un volume de 10 ml de substrat de Berridge dans un tube à essai porté à 30°C dans un bain Marie puis noter le temps de floculation. 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. Au moment de la floculation, des petits flocons apparaissent au sein de ce film : c'est le temps de floculation.

### **I.3.3. Force coagulante**

L'activité coagulante peut être également exprimée en force coagulante de Soxhlet (TSOULI, 1979 ; NOUANI *et al.*, 2009). Cette force coagulante définit le volume de lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique ou d'une enzyme, en 40 minutes, à 35°C et pH 6,4 du substrat (lait).

La force coagulante est exprimée par la formule suivante :

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

**F** : Force de l'enzyme (Soxhlet) ;

**V** : Volume du lait ajusté (pH : 6,4, T° :35°C) ;

**v** : Volume de la solution enzymatique ;

**T** : Temps de coagulation du lait (en secondes) ;

Temps standard du test = 2400 secondes (40 min).

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.3.4. 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.3.5. Activité protéolytique**

L'activité protéolytique de l'extrait enzymatique est déterminée selon la méthode de GREEN et STACKPOOLE, (1975). Cette mesure permet d'évaluer le taux de dégradation du substrat (caséine) par l'enzyme pendant la phase primaire (phase enzymatique). Pour cela,

nous avons mesuré la concentration des produits d'hydrolyse de la caséine, solubles dans l'acide trichloracétique (TCA) à 12% concentration finale.

L'addition de TCA dans le milieu réactionnel stoppe la réaction et une filtration permet de séparer le précipité de caséine et les produits d'hydrolyse solubles.

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 établi à partir de concentration en tyrosine variant de 10 à 100  $\mu\text{g/ml}$  (figure 08 : C).

### ➤ **Mode opératoire**

Deux millilitres de la solution de caséine à 1% dans le tampon acétate de Na de pH = 5,2 sont additionnés de 1ml de l'extrait enzymatique dilué. Le mélange réactionnel ainsi préparé est incubé pendant 10 min à 35°C. Après incubation, la réaction enzymatique est arrêtée par addition de 5 ml de solution trichloracétique (TCA) à 19%, après un temps de repos de 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. Les activités protéolytiques des extraits de ficine et de pepsine sont comparées à celle de la présure.

### **I.3.6. Profil électrophorétique**

Pour déterminer les poids moléculaire des constituants des extraits enzymatiques, un kit de protéines de référence est utilisé (68 KDa, 66 KDa et 36 KDa). Dans notre travail nous avons utilisé l'électrophorèse SDS-PAGE selon le protocole décrit par LAEMMELI (1970).

Le sodium dodécyl sulfate (SDS) de formule  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$  est un détergent anionique qui se fixe aux protéines et leurs confère ainsi une charge globale négative. Si ces dernières sont mises dans ces conditions sous un champ électrique, elles ne pourront se séparer que sur la base de leur taille et leur forme, autrement dit selon leurs poids moléculaire (PM).

La séparation est conduite selon la méthode de LAEMMELI et FAVRE (1973), qui se base sur un système biphasique, un gel de concentration sur un gel de séparation où les concentrations d'acrylamide et son co-monomère, le NN', méthylène bis acrylamide, sont définies par les paramètres T et C

$$T = ((a+b)/v).100\%$$

$$C = (b/a+b).100\%$$

Où a : acrylamide (g) ; b : bis acrylamide (g) ; v : volume de la solution (g).

### **I.3.6.1. Préparation des échantillons**

La préparation de l'échantillon consiste à dénaturer les protéines dans une solution de dénaturation dont la composition : 37,84 g/l de Tris-HCl, 0,14 g/l d'EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid), 23,2 g/l DTT (DL-Dithioireitol), 75 g/l de SDS, 0,5g/l de Bleu de bromophénol et 250 g/l de glycérol, son pH est ajusté à 6,8 par ajout de HCl.

A 60 µl de chaque échantillons, sont ajouté 15 µl de tampon de dénaturation . Les échantillons sont ensuite chauffés dans un bain Marie à une température de 90°C pendant 5 minutes afin d'accélérer la dénaturation, puis sont conservés au congélateur jusqu'à utilisation.

### **I.3.6.2. Dépot, migration et révélation des protéines**

Déposer 15 µl de chaque échantillon dans le gel polymérisé. Remplir la cuve de migration par le tampon de migration qui se compose de : 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 0,1%de SDS, son pH est ajusté à 8,3. La migration se produit sous une tension de 90 volts pendant 15 à 20 min. Ensuite elle se poursuit à 140 volts pendant 2 à 3 heures.

A la fin de la migration, le gel est démoulé et mis dans une solution de fixation (30 % éthanol et 5 % acide acétique) pendant 30 minutes. Le gel est ensuite coloré (solution de 40% de l'éthanol, 10 % d'acide acétique et 2,9 mM du bleu de Coomassie R 250) pendant 2 heures sous agitation. Enfin, une décoloration du gel par des lavages successifs est effectuée sous agitation dans la solution de décoloration, qui a déjà servie pour la fixation.

## **I.4. Détermination des conditions optimales d'activité des extraits de ficine et de pepsine**

### **I.4.1. pH optimal**

Le pH a une forte influence sur l'activité enzymatique et par conséquent sur le temps de floculation du lait (RAMET, 1997 ; HUPPERTZ *et al.*, 2006 ).

Pour étudier l'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique, le pH du lait (substrat de Berridge) est ajusté aux valeurs suivantes: 5 ; 5,5 ; 6,0 ; 6,2 ; 6,4 ; 6,6 ; 6,8 ; 7,0 par addition d'une solution d'HCl ou de NaOH 1N. Le choix de cet intervalle de pH est basé sur le fait qu'à des valeurs de pH inférieur à 5 la coagulation peut devenir une coagulation acide. L'augmentation du pH à des valeurs supérieures à 7,0 peut provoquer l'inactivation de la protéase employée. 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.4.2. 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 30 à 80 °C en fixant la température aux valeurs suivantes : 30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 ; 55 ; 60 ; 65 ; 70, 75, 80.

Le choix de ces températures est justifié par le fait que la coagulation du lait en fromagerie s'effectue à des températures supérieures à 30°C, mais à partir de 70°C l'extrait enzymatique risque d'être inactivé (RAMET, 1985). Pour les extraits d'origine végétale, cette température est insuffisante pour les inactiver (thermorésistantes) ce qui nous a poussé à utiliser des températures plus élevées pour déterminer l'optimum d'activité.

L'activité coagulante mesurée pour chaque valeur de température est donnée par la moyenne de trois essais répétés et tous les essais sont réalisés dans les mêmes conditions de pH et de concentration en CaCl<sub>2</sub>.

#### **I.4.3. Concentration du lait en CaCl<sub>2</sub>**

Afin de déterminer la concentration en CaCl<sub>2</sub> qui permet d'obtenir le meilleur temps de floculation, nous avons fait varier les concentrations de lait en CaCl<sub>2</sub> dans la gamme suivante: 0,005M, 0,01M, 0,02M, 0,03M, 0,04M et 0,05M. Le temps de floculation est mesuré pour chaque concentration, dans les mêmes conditions de pH et de température.

#### **I.5. Etude des interactions impliquées dans la formation du coagulum**

La méthode utilisée est celle décrite par LEFEBVRE-CASES *et al.*, (1998) ; BOUGHELLOUT, (2007) ; BENYAHIA-KRID *et al.*, (2010) ; ZIKIOU, ( 2013). Le principe est basé sur la destruction des interactions impliquées dans la formation et le maintien des structures des gels par des agents dissociants : Sodium dodecyl sulfate (SDS), urée, et acide éthyle diamine tétra acétique (EDTA)

L'urée dénature la protéine en rompant les liaisons hydrogènes intramoléculaires. Les détergents ioniques tels que le SDS sont incapables de détruire les liaisons hydrogènes des peptides qui stabilisent la structure secondaire des protéines. Cependant, le SDS réagit avec les groupes chargés des chaînes latérales des protéines provoquant ainsi des répulsions électrostatiques intramoléculaires conduisant à une destruction compétitive des interactions

hydrophobes. L'EDTA est utilisé comme agent chélateur du calcium et permet d'estimer l'importance des liaisons calciques.

Le lait destiné à l'étude des interactions est maintenu à 30°C pendant 2 heures pour s'équilibrer, puis la présure, la ficine ou la pepsine est additionnée (1 ml de la dilution qui donne un temps de floculation de 15 min pour 10 ml de lait), après un temps de floculation de 15 min, suivi de 15 min supplémentaires, le gel formé est dilué avec la solution dissociante à raison de 1/5 (4ml de gel dans 16ml de l'agent dissociant). Pour l'échantillon témoin, le gel est dilué dans de l'eau distillée. Les échantillons sont ensuite homogénéisés rapidement à l'aide d'un Polytron (KINEMATICA AG. PT 2100. SUISSE) pendant 30 secondes à 20000t/min. Les dispersions de gel ainsi obtenues sont ensuite ultra centrifugées à 26000g pendant 90 min. Le surnageant est délicatement récupéré et stocké à 4°C jusqu'à analyse.

Les protéines libérées dans le surnageant sont estimées par dosage de Lowry, en se référant à une courbe d'étalonnage de la caséine (figure 08. B). Pour chaque type d'agent dissociant nous avons procédé à trois répétitions, les résultats seront exprimés en moyenne suivi de l'écart type. Le niveau de signification des différences de l'effet de chaque agent dissociant par type de gel sera étudié par une analyse de la variance (ANOVA).

## **I.6. Essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type « Camembert »**

Les extraits enzymatiques étudiés : ficine et pepsine de poulet ont été utilisés comme succédanés 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 la laiterie SAFILAIT de Ain Smara wilaya de Constantine.

### **I.6.1. La technologie de fabrication de Camembert au niveau de SAFILAIT**

Le lait frais collecté est refroidi à 4°C et stocké dans des tanks isothermes. Il est pasteurisé à une température de 72 °C pendant 15 à 20 secondes, puis maintenu à une température de 36 °C environ, enrichi en calcium par ajout d'une solution de CaCl<sub>2</sub>. Il estensemencé par les ferments lactiques (d'acidification) et ferments d'affinage. Après une période d'incubation de 30 minute environ, les ferments abaissent le pH par fermentation du lactose et production d'acide lactique et le pH requis est atteint (pH = 6 à 6,4 et une acidité de 20°D).

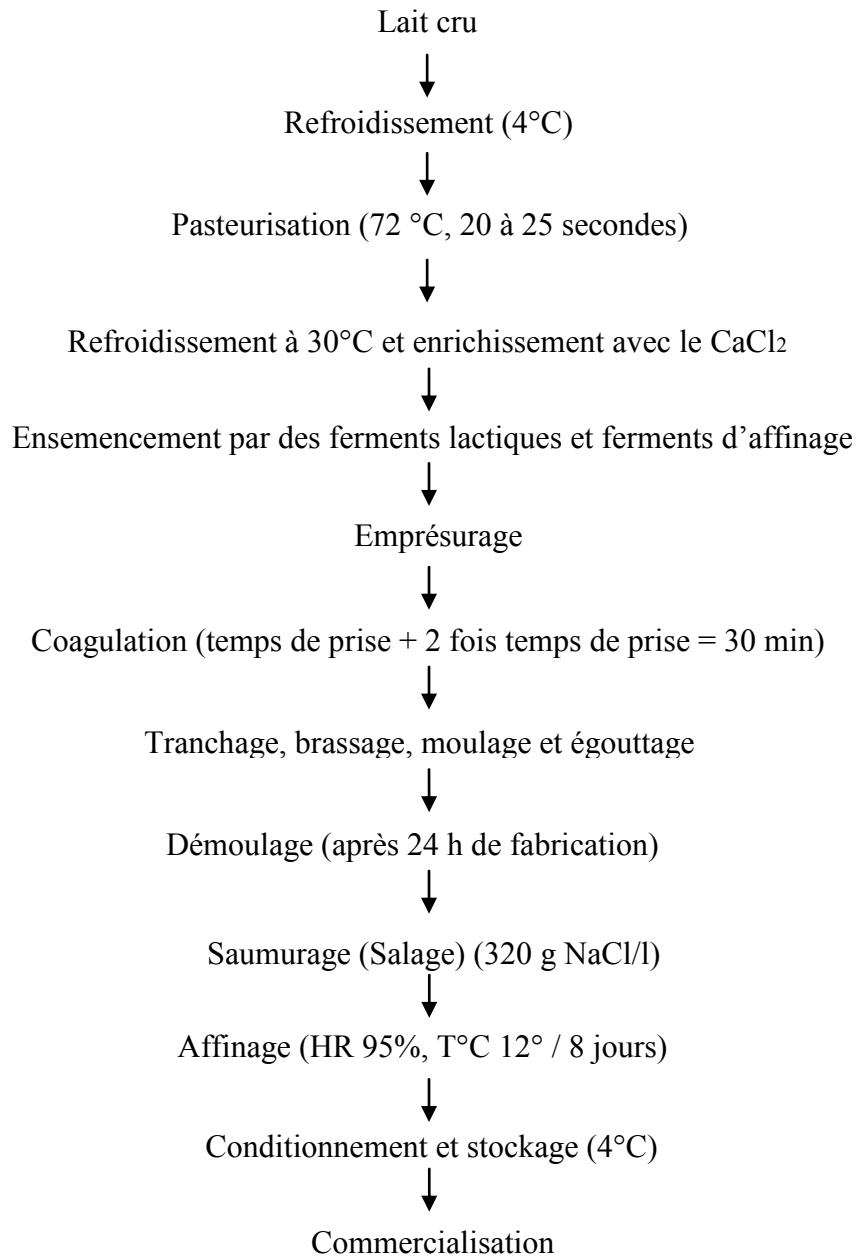
Le lait ainsi enrichi et acidifié est réparti dans des bassines de 100 litres, une quantité de présure (35 ml environ) suffisante pour donner un temps de coagulation d'environ 10 minute est versée au préalable dans les bassines. Deux d'entre ces bassins contenant 50 litres de lait chacune, sontensemencées par l'extrait de ficine pour la première et l'extrait de la pepsine pour la deuxième, les quantités d'extrait ajoutées ont été fixées pour donner un temps de coagulation proche de celui fixé par la laiterie (environ 10 min).

Après coagulation, le caillé est tranché verticalement et horizontalement pour 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).

Le tranchage est suivi d'un brassage qui consiste à mélanger le caillé pour activer la synérèse et permettre au lactosérum de remonter à la surface et au caillé de précipiter. Nous avons réalisé 2 à 3 brassages selon le caillé, jusqu'à libération de 30 à 40 % du volume total de lactosérum qui sera éliminé. Cette étape est suivie d'un moulage et d'un égouttage qui consiste à verser le caillé dans des moules de forme ronde pour permettre l'égouttage ou la diffusion du lactosérum, donc le durcissement de la pâte. Après 30 minutes de moulage, nous avons effectué le premier retournement, suivi de deux retournements après 8 et 16 heures de fabrication, enfin le démoulage après 24 heures de fabrication, puis saumurage (320 g NaCl/l d'eau), le fromage salé est affiné dans un hâloir conditionné par deux paramètres principaux : une humidité relative de 90 à 95 % et une température de 12 °C pendant huit jours, ce qui permet le développement de *Penicillium camemberti* sur la pâte et donne la couleur blanche caractéristique de la croûte. Durant l'affinage, le fromage subit des retournements au quotidien pour permettre l'obtention d'une croûte homogène. Afin d'estimer l'influence de nos extraits coagulants sur l'évolution de la texture, la protéolyse et caractéristiques organoleptiques du fromage type Camembert, nous avons comparé avec le fromage témoin fabriqué par l'unité en utilisant la chymosine microbienne.

La figure 09 présente le diagramme de fabrication au niveau de l'unité fromagerie de SAFILAIT.





**Figure n° 09 :** diagramme de fabrication au niveau de l'unité fromagerie de SAFI LAIT.

### Remarque

Pour l'emprésurage, nous avons utilisé la présure microbienne pour les fromages témoins (18 ml/50 l), la ficine (7 ml/50 l) et la pepsine de poulet clarifiée (50 ml/50 l) pour les fromages testés.

## **I.6.2. Analyses physicochimiques de lait utilisé pour la fabrication du fromage**

### **I.6.2.1. Détermination du pH (AFNOR, 1993)**

La détermination de pH est réalisée de la même manière que pour le substrat de Berridge.

### **I.6.2.2. Acidité titrable (AFNOR, 1993).**

La détermination de l'acidité titrable est réalisée de la même manière que pour le substrat de Berridge

### **I.6.2.3. Extrait sec total (EST)**

La détermination de l'EST est réalisée de la même manière que pour la substrat de Berridge.

### **I.6.2.4. La densité (NA n° 2787, 1993)**

La densité d'un liquide est le rapport entre la masse volumique de ce liquide et celle d'un même volume d'eau à 15°C.

#### ➤ **Mode opératoire**

À l'aide d'un thermo lactodensimètre que l'on plonge dans une éprouvette contenant le lait, la densité est lue sur le ménisque formé par le lait et la température est directement lue sur la partie graduée. La densité relevée peut être corrigée, si la température du lait est différente de 15°C par la formule suivante valable pour une mesure faite entre 10 et 20 °C :

$$D = d + 0,2 (T^{\circ} - 15^{\circ}C)$$

D : densité corrigée, d : densité brute, T° : température

### **I.6.2.5. Teneur en matière grasse (méthode de Gerber. ISO : 3433-2002).**

La matière grasse du lait est déterminée par la méthode de Gerber ou méthode acidobutyrométrique

#### ➤ **Principe**

Le principe est la séparation de la matière grasse du lait par centrifugation, dans un butyromètre, après avoir dissous les protéines du lait par l'acide sulfurique. La séparation de la matière grasse est favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool iso-amylique.

#### ➤ **Mode opératoire**

Introduire 10 ml d'acide sulfurique dans le butyromètre (de densité 1,813–1,825) puis ajouter 10 ml de lait bien agité. Verser à la surface 1 ml d'alcool iso-amylique. Boucher le

butyromètre et agiter jusqu'à dissolution complète. Le butyromètre est ensuite placé dans une centrifugeuse (1200 t/min) pendant 5 min et à une température de 65°C. Deux phases apparaissent : l'une foncée et l'autre claire. Cette dernière représente la quantité en pourcentage de matière grasse dans le lait qu'on peut lire sur l'échelle graduée du butyromètre.

#### **I.6.2.6.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 :  $ESD = EST - MG$ .

### **I.6.3. Analyses effectuées pour les fromages fabriqués**

#### **I.6.3.1. Echantillonnage**

Les échantillons qui ont servis pour les différentes analyses sont prélevés à différentes durées de l'âge du fromage, selon le programme suivant :

- Le jour de salage et d'introduction de fromage à l'hâloir (J. 1) ;
- Après 6 jours d'affinage (J. 6) ;
- A la fin d'affinage (après 13 jours de fabrication) (J. 13) ;
- Après 20 jours de fabrication (J. 20) ;
- Après 28 jours de fabrication (J. 28) ;
- Après 37 jours de fabrication (J. 37).

Après affinage (13<sup>ème</sup> journée), les pièces de fromage ont été mises à une température de 4 à 8°C, dans un réfrigérateur.

#### **I.6.3.2. Analyses physico-chimiques des fromages fabriqués**

##### **I.6.3.2.1. Détermination de pH**

Le pH est déterminé par introduction de l'électrode (sonde) de pH et de température dans une masse de fromage stabilisé à une température de 20 à 25°C. La mesure est répétée trois fois pour chaque échantillon.

##### **I.6.3.2.2. Extrait sec total**

L'analyse est réalisée de la même façon que le lait, mais ici la prise d'essai est de 3 grammes de fromage.

### I.6.3.2.3. Le rendement de la production

Le rendement fromager ou le rendement de la transformation du lait en fromage est l'expression mathématique de la quantité de fromage obtenu à partir d'une quantité donnée de lait (souvent 100 litres ou 100 kg) (VANDEWEGH, 1997, JEANTET *et al.*, 2008). Le rendement fromager est exprimé selon la formule suivante (LIBOUGA *et al.*, 2006) :

$$Rdt = \frac{EST \text{ (lait)} - EST \text{ (sérum)}}{EST \text{ (coagulum)} - EST \text{ (sérum)}}$$

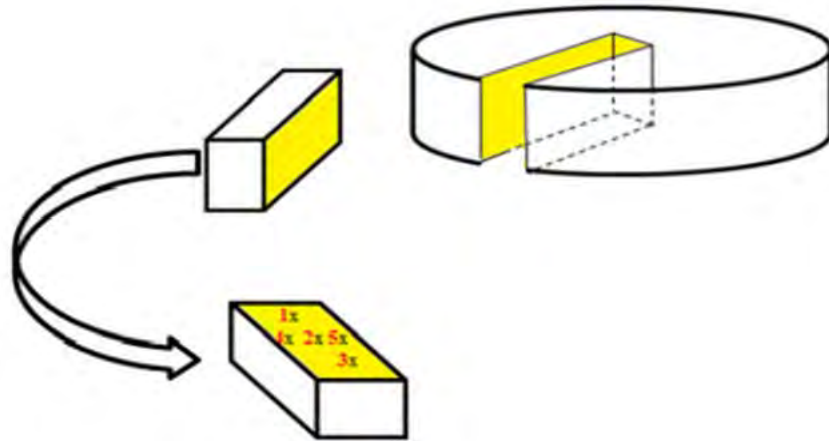
### I.6.4. Suivi de l'évolution de la texture

La texture est un élément majeur dans la détermination de la qualité des fromages à pâte molle. Dans le cas précis du camembert, on assiste au cours de la maturation au ramollissement de la partie externe du fromage. Cette zone modifiée s'étend progressivement vers l'intérieur, dans certains cas on peut même observer des pâtes coulantes. Ce changement de texture est généralement attribué à l'activité des différentes protéases présentes dans le fromage y compris l'agent coagulant utilisé (ABRAHAM *et al.*, 2006, WRIGHT *et al.*, 2001). La texture peut être évaluée au moyen de techniques instrumentales ou sensorielles, la méthode instrumentale présente l'avantage d'être corrélée à l'analyse 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 10 montre la méthode de préparation de l'échantillon pour la pénétrométrie.

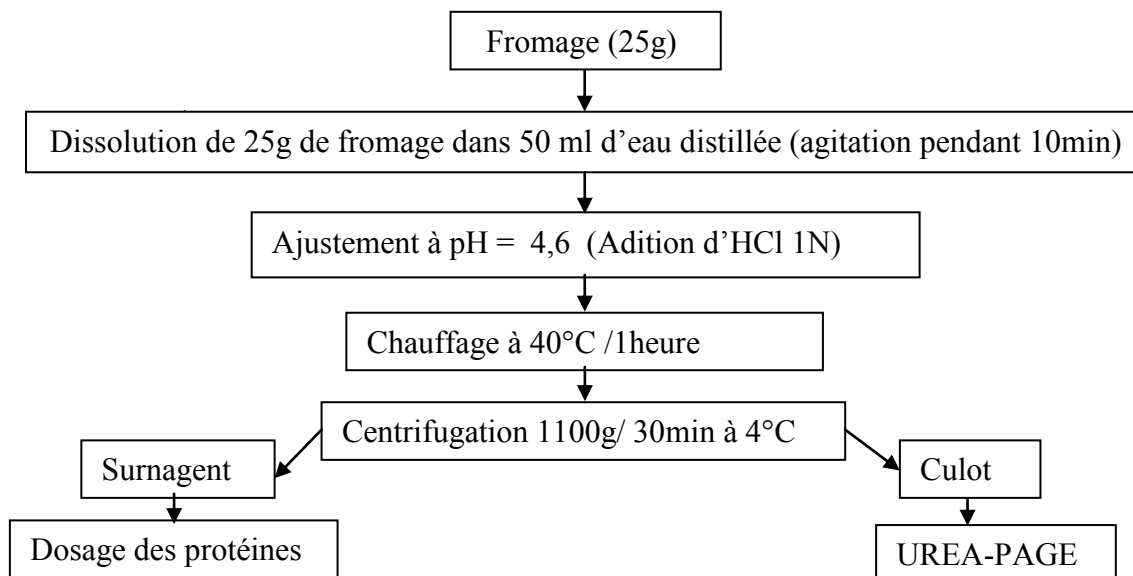
### I.6.5. Suivi de la protéolyse

Le degré de protéolyse est suivi par dosage qualitatif (électrophorèse UREA-PAGE sur la fraction protéique insoluble à pH 4,6) et quantitatif (dosage par la méthode de Lowry de la fraction soluble à pH 4,6) des protéines, pour séparer les deux fractions protéiques, nous avons utilisé le protocole proposé par FALLICO *et al.*, (2004). La figure 11 résume les principales étapes de separation des fractions protéiques solubles et insoluble à pH 4,6.



**Figure n° 10** : Préparation de l'échantillon pour le test de pénétrométrie.

Une masse de 25 g de fromage est dissoute dans 50 ml d'eau distillée par homogénéisation au Stomacher pendant 10 minutes ; Après homogénéisation, le pH est ajusté par addition d'une solution d'HCl 1N jusqu'à stabilisation à 4,6, ensuite les échantillons sont chauffés au bain Marie pendant 1 heure à 40 °C, pour la séparation des deux phases, une centrifugation de 11000 g à 4°C pendant 30 min est nécessaire. Le culot est récupéré pour le suivi qualitatif (UREA-PAGE), le surnageant obtenu servira au suivi quantitatif (dosage Lowry).



**Figure n° 11** : Extraction des fractions protéiques solubles et insolubles à pH = 4,6 (FALLICO *et al.*, 2004).

### I.6.5.1. Suivi qualitatif par électrophorèse UREA-PAGE

Pour la séparation des protéines de la fraction insoluble nous avons opté pour l'électrophorèse en présence d'urée (UREA-PAGE). Elle est particulièrement adaptée pour la séparation des protéines non globulaires comme les caséines (PELLISSIER, 1984). La sensibilité et le pouvoir de résolution de cette technique lui ont valu d'être considérée comme un outil performant pour l'évaluation de la protéolyse des caséines. Ceci est rendu possible par l'action des agents dissociants utilisés, dont le rôle est de rompre les liaisons hydrogènes (cas de l'urée) et les ponts disulfures (cas du  $\beta$ -mercaptoéthanol), permettant ainsi aux entités protéiques de migrer sous leur forme la plus simple (DAMERVAL *et al.*, 1993).

L'UREA-PAGE est réalisée selon la méthode proposée par ANDREWS (1983), dans un système composé de deux gels complémentaires : un gel supérieur dit gel de concentration (4% p/v d'acrylamide), dont le tampon est constitué de 8,30 g/l de Tris, 300g/l d'urée et un pH de 7,6 et un deuxième gel inférieur dit gel de séparation (12% p/v acrylamide), son tampon contient : 64,30 g/l de Tris, 385,7g/l d'urée et un pH de 8,9. La composition globale des deux gels est présentée en tableau 04.

**Tableau n° 04** : composition des gels d'acrylamide en milieu urée

	Gel de séparation	Gel de concentration
Solution tampon de gel de séparation	52,5 ml	/
Solution tampon de gel de concentration	/	45 ml
Solution d'acrylamide 40% (p/v)	22,5 ml	5 ml
Bis-acrylamide	0,375 g	0,1 g
Temed	37,5 $\mu$ l	25 $\mu$ l
APS (Ammonium Persulfate)	282 $\mu$ l	300 $\mu$ l

#### I.6.5.1.1. Préparation et dépôt des échantillons

Pour la préparation des échantillons nous avons solubilisé 10 mg de chaque échantillon dans 1 ml de tampon de solubilisation (de dénaturation ou tampon échantillon), qui est composé de 7,5 g/l de tris, 490 g/l d'urée et a un pH de 8,4, le mélange est additionné de 10  $\mu$ l d'une solution à 1% de bleu de bromophénol puis agiter jusqu'à solubilisation totale de l'échantillon. 15  $\mu$ l de chaque échantillon sont déposés dans un puits de gel déjà polymérisé et la migration est lancée.

#### **I.6.5.1.2. Migration et révélation des protéines**

La migration s'effectue dans une cuve pleine d'une solution de migration (3 g/l tris, 14,6 g/l glycine et pH = 8,4), en appliquant un courant de 90 v jusqu'à ce que le front de migration atteigne le gel de séparations (20 à 30 minute environ), puis un courant de 180 v pendant 2 heures. A la fin de la migration, les gels obtenus sont colorés dans une solution de coloration (10 % d'acide acétique, 30 % d'alcool (éthanol), 60% d'eau distillée et 0,025% bleu de coomassie) pendant 2 heures, la décoloration se fait dans une solution de décoloration (5% acide acétique, 30% éthanol et 65% eau distillée).

#### **I.6.5.2. Suivi quantitatif de la protéolyse dans le fromage**

Le suivi quantitatif de la protéolyse dans les trois fromages fabriqué est réalisé par dosage de la fraction protéique soluble à pH 4,6, la méthode utilisée est celle décrite par LOWRY *et al.*, (1951).

Les résultats obtenus sont exprimés en mg de protéines solubles à pH 4,6 par rapport aux protéines totales (Protéines solubles (P.S.) / protéines totales (P.T.)).

#### **I.6.6. Analyses sensorielles**

Les tests sensoriels peuvent être classés de plusieurs façons. Les statisticiens les classent comme étant paramétriques ou non paramétriques selon le type de données obtenues. Les spécialistes de l'analyse sensorielle et les chercheurs en alimentation les classent en tests axés sur le consommateur (affectif) ou axés sur le produit (analytique) en fonction de l'objectif à atteindre. Les tests qui servent à évaluer la préférence, le niveau d'acceptation ou le degré de goût des consommateurs pour les produits alimentaires sont dits axés sur le consommateur. Les tests servant à déterminer les différences entre les produits ou à mesurer des caractéristiques sensorielles sont dits axés sur le produit (WATTS *et al.*, 1991).

Nous avons réalisé l'analyse sensorielle dans le but de constater les changements induits par le remplacement de l'agent coagulant utilisé quotidiennement en fromagerie (présure), par les extraits enzymatiques étudiés (ficine et pepsine de poulet) ainsi que pour estimer le degré d'acceptabilité de nouveau produit par les consommateurs.

Pour arriver aux objectifs fixés par cette analyse nous avons réalisé deux tests, le test de classement par rang et le test descriptif ou d'intensité.

### **I.6.6.1. Le panel de dégustation**

L'instrument de vérification pour l'analyse sensorielle est le panel de personnes (les sujets) qui ont été recrutées pour réaliser des tâches précises d'évaluation sensorielle (FELIX et STRIGLER, 1998).

Notre panel de dégustation est composé de 10 sujets, étudiants en graduation, étudiants en post-graduation et enseignants de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (I.N.A.T.A.A.). Les sujets sont recrutés selon leur motivation et leur disponibilité pour participer aux tests. Avant de procéder aux tests nous avons montré aux sujets la façon dont les bulletins seront remplis, en se servant d'un bulletin brouillon.

Il faut recommander aux dégustateurs d'éviter l'utilisation de produits à odeur prononcée, comme les savons et les parfums avant de participer à un panel et d'éviter de manger, de boire ou de fumer avant de participer aux essais.

### **I.6.6.2. Local**

L'analyse sensorielle a été réalisée au Laboratoire de Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.) équipe Transformation et Elaboration de Produits Alimentaire (T.E.P.A.) de l'I.N.A.T.A.A.

### **I.6.6.3. Déroulement des tests**

Les analyses sensorielles ont été partagées en deux tests ; test de classement par rang et test d'intensité. Avant l'analyse, les échantillons à analyser sont au préalable découpés en tranches triangulaires d'environ 15 g et équilibrées à la température ambiante.

### **I.6.6.5. Le test de classement par rang**

Le test de classement par rang a pour objectif de déterminer la mesure dans laquelle le consommateur accepte un produit. Comme il peut servir, à obtenir des renseignements préliminaires sur des différences entre les produits préparés avec les différents agents coagulants étudiés.

#### **➤ Déroulement de test**

Nous présentons aux dégustateurs trois échantillons dans des contenants identiques, codés au moyen d'un numéro aléatoire à 3 chiffres. Chaque échantillon a un numéro de code différent. Tous les échantillons sont présentés au même temps à chaque dégustateur.



On demande aux dégustateurs de classer par rang des échantillons codés en fonction de l'acceptation en allant du moins acceptable au plus acceptable.

➤ **Traitement des résultats**

Le total des classements attribués à chaque échantillon est réalisé. Ensuite la signification des différences est déterminée en comparant les totaux des classements pour toutes les paires possibles des échantillons en se servant du test de Friedman. Les différences entre toutes les paires possibles des classements totalisés sont comparées à la valeur critique du tableau donné dans l'annexe 03, pour un niveau de signification de 5 %.

**I.6.6.6. Test d'intensité**

Au cours de ce test, les dégustateurs doivent noter les échantillons, sur des échelles linéaires ou selon l'intensité perçue d'une caractéristique sensorielle (attribut). Les dégustateurs donnent ainsi une description sensorielle totale de l'échantillon de point de vue : apparence, odeur, saveur, texture et arrière-goût (fiche annexe 03).

Le test descriptif permet donc de déterminer le profil sensoriel de l'échantillon et de mesurer l'importance des différences entre les échantillons.

➤ **Déroulement du test**

Les échantillons sont présentés dans des contenants identiques, codés avec un numéro aléatoire à 3 chiffres (ou une lettre (A, B ou C)). Chaque échantillon a un numéro distinct, et dans une fiche conçue pour le test descriptif (Annexe 03) chaque dégustateur note l'intensité perçue des caractères choisis de chaque échantillon sur un échelle allant de 1 (faible intensité) à 9 (forte intensité).

➤ **Traitement des résultats**

Les notes de chaque échantillon sont présentées sous forme de tableau et analysées au moyen de l'analyse de variance (ANOVA) à l'aide d'un logiciel statistique XLSTAT (2009) afin de déterminer s'il y a des différences significatives entre les échantillons au seuil de signification de 5%. Ainsi que le profil sensoriel pour chaque journée sera établi au moyen de Microsoft Excel 2007.

*Résultats et  
discussion*

## II.1. Caractéristiques physico-chimiques du lait utilisé

Les caractéristiques physicochimiques de la poudre de lait écrémé (SOLARC.S.A. Belgique) et celle du substrat de BERRIDGE (dissolution de 12 g de la poudre de lait écrémé dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01M) sont présentées en tableau 05.

**Tableau n° 05 :** caractéristiques physicochimiques de la poudre de lait et du substrat de Berridge.

	Substrat de Berridge	Poudre de lait
EST (%)	10,78 ± 0,95	91,17± 0,48
pH	6,40 ± 0,03	/
Acidité titrable (g/l)	1,658 ± 0,023 (16,58°D)	/

Le lait reconstitué selon la méthode de Berridge présente un pH de 6,4, une acidité estimée à 16,58°D et un extrait sec total (EST) de 10,78%. Ces valeurs sont proches de celles données par différents auteurs (pH 6,6, acidité titrable 15 à 17°D et EST de 10 à 13%) (AFNOR, 1993 ; RIBADEAU-DUMAS, 1991 ; SILVA et MALCATA, 2005).

## II.2. Caractéristiques des extraits enzymatiques

L'extraction de la ficine à partir du latex est effectuée par centrifugation (3200g pendant 15 min à 4°C). Le rendement est d'environ 71,42% (7,4 ml de la ficine brute pour 10 ml de latex). Les caractéristiques de l'extrait de ficine et de pepsine de poulet sont présentées en tableau 06.

**Tableau n° 06 :** Principales caractéristique des enzymes extraites

Caractéristiques	Ficine	Pepsine
Taux de protéine (mg/ml)	89,31 ± 0,96	20,10 ± 0,73
Activité coagulante (UAC) (UP)	121,09 ± 4,81	18,61 ± 0,33
Force coagulante	1/42059,76	1/6041,64
Activité spécifique UP/mg	1,35	0,92
Couleur	Brune claire	Jaunâtre
Texture	Visqueux	Liquide

L'extrait clarifié de pepsine de poulet, est obtenue selon le protocole proposé par BOHAK (1970), (macération de 100g de proventricules de poulet dans 300 ml d'une solution saline de 30g/l de NaCl et 7g/l de NaHCO<sub>3</sub>). Le rendement d'extraction est d'environ 84,43

% (pour 100 g de proventricules nous avons récupéré  $253,29 \pm 5,06$  ml d'extrait enzymatique clarifié). Le rendement exprimé en unité d'activité coagulante par 100g de proventricules est égale à 4714 U.P. Ce rendement correspond à l'activité enzymatique du volume total de l'extrait obtenu de l'extraction à partir de 100g de proventricules de poulet dans 300ml de solution d'extraction. Les caractéristiques de l'extrait enzymatique clarifié sont présentées en tableau 08.

L'extrait de la ficine obtenu est une solution visqueuse de couleur brune claire. Ces caractéristiques sont confirmées par les résultats de NOUANI *et al.*, (2009). Caractérisé par une teneur en protéine de  $89,31 \pm 0,96$  mg/ml, cette valeur est inférieure à celles obtenues par FADYLOGLU, (2001) ; WILLIAMS *et al.*, (1968) évaluée à 116 mg/ml et 156 mg/ml respectivement. Elle est également inférieure à celle obtenue par DEVARAJ *et al.*, (2008b) pour la ficine extraite de latex de *Ficus racemosa* qui est de 156 mg/ml.

Son activité coagulante est de 121,09 U.P. Ces résultats sont inférieurs à ceux rapportés par NOUANI *et al.*, (2009), FADYLOGLU, (2001) estimé à 1500 U.P. et WILLIAMS *et al.*, (1968) évalué à 320 U.P.. La force coagulante de l'extrait obtenu est de  $1/42059,76$ . En terme de quantité de lait coagulable, 1ml de cet extrait enzymatique peut coaguler environ 42 litres, donc 10 ml de latex peuvent coaguler environ 310 litres de lait, cette force est très proche de celle rapportée par NOUANI *et al.*, (2009) qui est de  $1/40000$ . L'activité spécifique de la ficine est de 1,35 UP/mg. Ce résultat est proche de celui obtenu par WILLIAMS *et al.*, (1968) évalué à 2,05.

En comparant ces résultats avec ceux des cardosines, enzymes végétales traditionnellement utilisée en fromagerie nous constatons que la ficine est dotée d'une activité coagulante, d'une force coagulante et d'un taux en protéines supérieurs a ceux des cardosines obtenus par différents auteurs (MARTINS *et al.* 1996 ; NOUANI *et al.*, 2009 ; ZIKIOU, 2013)

L'extrait clarifié de pepsine obtenu selon le protocole de BOHAK, (1970) est une solution de couleur jaunâtre. Ce résultat est comparable à celui rapporté par ADOUI, (2007). Il a la même couleur que celle d'une présure extraite par macération à partir des caillettes de veau (FAO, 1988), le rapport indiqué pour l'extraction de la présure est de 80 g de caillettes pour 1000 à 1600 ml de la solution de macération (VEISSEYRE, 1979 et WANGOH *et al.*, 1993). Le protocole que nous avons appliqué recommande 100g de proventricules de poulet pour 300 ml de la solution de macération. La teneur en protéines de l'extrait clarifié de

pepsine de poulet obtenu est de 20,10 mg/ml. Ce résultat est supérieur à celui obtenu par ADOUI, (2007) qui est de 8,77 mg/ml et largement inférieur à celui obtenu par NOUANI *et al.*, (2011) ayant une valeur de 147,3 mg/ml.

L'extrait clarifié de la pepsine de poulet a une activité coagulante de 18,61 U.P. Cette activité est supérieure aux activités obtenues par NOUANI *et al.*, (2011) évalué à 13,33 U.P., par BOUGHELLOUT, (2007) estimé à 2,42 U.P., par ADOUI, (2007) qui est de 15,08 U.P. et PAEZ DE LEON *et al.*, (1995) qui ont obtenu 5,52 U.P. En termes de force coagulante l'extrait de la pepsine que nous avons obtenu a une force de 1/6041,64. Ce résultat est supérieur à celui obtenu par NOUANI *et al.*, (2011) évalué à 1/3200 et par ADOUI, (2007) estimé à 1/2579 et une activité spécifique de 0,92 UP/mg. Avec une telle force la quantité d'enzymes récupérés de 100 g de proventricules peut coaguler environ 1620 litres de lait en 40 min et à 35 °C.

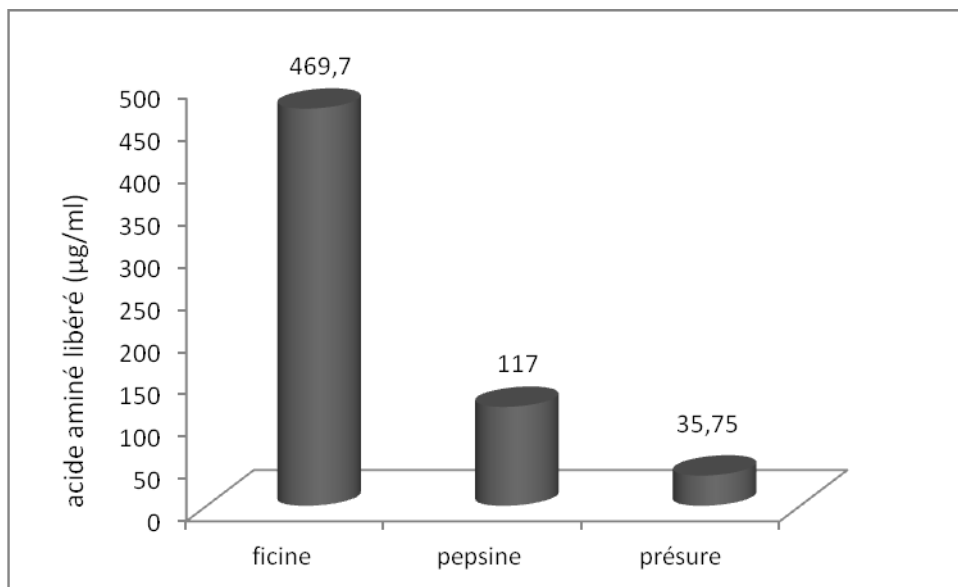
Par comparaison entre les deux extraits obtenus dans notre étude, nous remarquons que l'extrait d'origine végétale (ficine) a une activité coagulante, une force coagulante et une teneur en protéines plus élevée comparé à l'extrait d'origine animale (pepsine de poulet).

### **II.2.1. Activité protéolytique**

Toutes les enzymes coagulantes qu'elles soient d'origine animale, végétale ou microbienne, sont capables d'hydrolyser la caséine  $\kappa$ , provoquant ainsi la coagulation du lait. Toutefois cette condition est suffisante pour l'utilisation de ces enzymes en industrie fromagère (ALAIS, 1984), mais pour la production des fromages de qualité, il faut tenir compte de leur grande activité protéolytique non spécifique supplémentaire qui leur donne le pouvoir d'hydrolyser les caséines  $\alpha$  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 12 montre la quantité des produits d'hydrolyse libérés par chacune des enzymes étudiées.



**Figure n° 12 :** Quantité des produits d'hydrolyse libérés par les extraits enzymatiques étudiés.

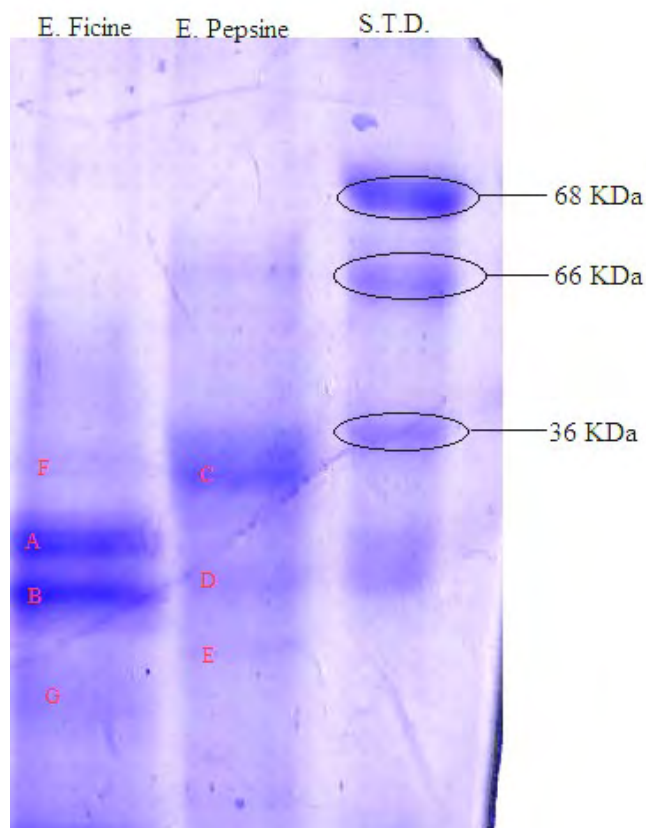
Pour cela, nous avons étudié l'activité protéolytique des extraits de ficine et de pepsine de poulet par comparaison à la présure animale par la méthode de GREEN *et* STACKPOOLE (1975). Les résultats ont montré que l'activité protéolytique de l'extrait de ficine est très élevée et elle est 4 fois plus élevée que celle de la pepsine et 13 fois celle de la présure. En effet, nous avons obtenu des valeurs de 469,7 μg/ml pour l'extrait de la ficine contre 117 μg/ml pour la pepsine de poulet et 35,75 μg/ml pour la présure. Cette activité protéolytique excessive de la ficine a été signalée par plusieurs auteurs (LYNN *et* CLEVETTE-RADFORD, 1986 ; ONER *et* AKAR, 1993; FADYLOGLU, 2001; NOUANI *et al.*, 2009 ; FACCIA *et al.*, 2012 *et* SHAH, *et al.*, 2014 ).

Concernant la pepsine de poulet nous avons obtenu une activité protéolytique 3 fois celle de la présure. En effet, nous avons obtenu des valeurs de 117 μg/ml pour la pepsine de poulet et 35,75 μg/ml pour la présure. Ce résultat est confirmé par plusieurs auteurs qui ont signalé une activité protéolytique de la pepsine supérieure à celle de la présure (STANLEY *et al.*, 1980; FINDLAY *et al.*, 1984). Par contre, GORDIN *et* ROSENTHAL, (1978) ont signalé des activités protéolytiques de la pepsine inférieure aux activités de la présure dans le fromage Cheddar, ainsi que ADOUI, (2007) *et* BOUGHELLOUT, (2007).

### II.2.2 Profil électrophorétique

Pour mieux caractériser les extraits enzymatiques étudiés, nous avons réalisé une électrophorèse SDS-PAGE pour visualiser et localiser les bandes protéiques de chacun des extraits étudiés (la ficine et la pepsine de poulet).

Les profils électrophorétiques des deux extraits (extrait de ficine et pepsine de poulet) sont présentés en figure 13.



**Figure n° 13** : Profil électrophorétique sur SDS-PAGE des extraits de ficine et de pepsine  
 STD : marqueurs de taille ; E. Ficine: extrait de la ficine ; E. Pepsine : extrait de la pepsine.

Le profil de l'extrait de la pepsine, montre une bande intense (C) d'un poids moléculaire d'environ 35 KDa. Selon BOHAK, 1969 ; GREEN et LLEWELLIN, 1973, le poids moléculaire de la pepsine de poulet est de 35 KDa. Donc la bande intense représente la pepsine de poulet clarifiée. Les bandes claires (D et E) qui sont apparues dans le gel sont des impuretés de fait que l'extrait n'est pas purifié.

Concernant le profil électrophorétique de l'extrait de la ficine, nous remarquons la présence de deux bandes très intenses qui ont des poids moléculaires d'environ 24 KDa (A) et 23 KDa (B) respectivement, ces bandes représentent le peptide de la ficine qui a un poids moléculaire compris entre 23 KDa et 26 KDa selon la bibliographie (DEVARAJ *et al.*, 2011 ; PAYNE, 2009 ; DEVARAJ *et al.*, 2008b ; KATSAROS *et al.*, 2008 ; LAWE, 1976). Comme nous remarquons l'apparition de deux bandes claires (F et G) dans le gel qui sont des impuretés.

### II.3. Conditions optimales de coagulation

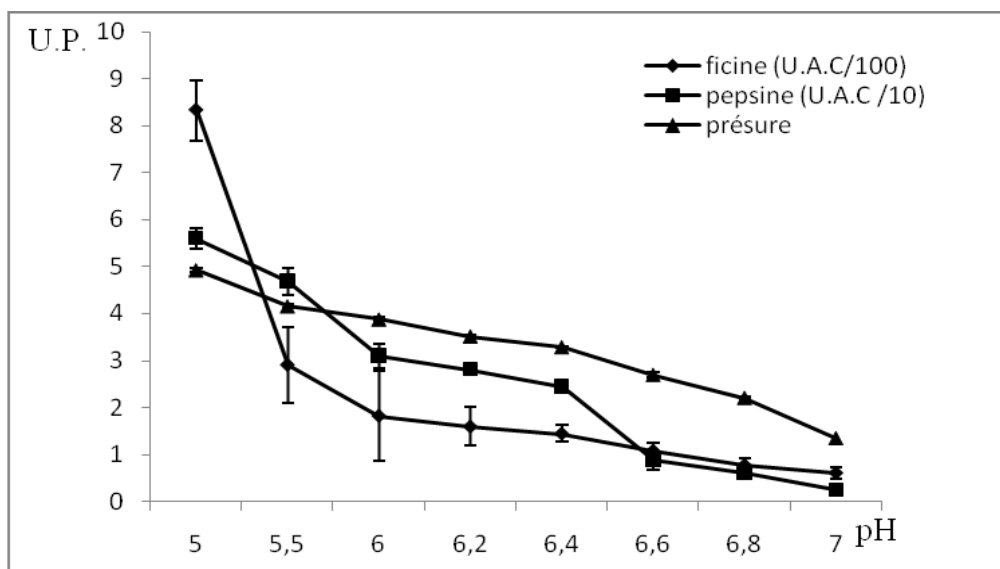
Plusieurs facteurs influent sur la coagulation tels que la concentration en enzymes, le pH du lait, la teneur en calcium, la composition en caséines, la dimension des micelles et les traitements préalables du lait (JEANTET *et al.*, 2008).

Dans le but de déterminer les conditions physico-chimiques optimales pour l'action de l'extrait de ficine et de pepsine, nous avons essayé de voir l'influence de certains paramètres sur leur activité coagulante par comparaison à la présure.

#### II.3.1. Effet de pH

L'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait de ficine, de pepsine et de la présure 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 et la concentration en CaCl<sub>2</sub> est de 0,01M.

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 des extraits enzymatiques étudiés en fonction du pH du lait.



**Figure n° 14 :** Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de ficine, de pepsine et de présure.

Les résultats présentés par la figure 16 indiquent une diminution de l'activité coagulante des trois préparations enzymatiques 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 832,91 U.P. Cette activité passe à 182,37 U.P. à pH 6,0 pour se stabiliser à 60,99 U.P. à pH 7,0. 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.

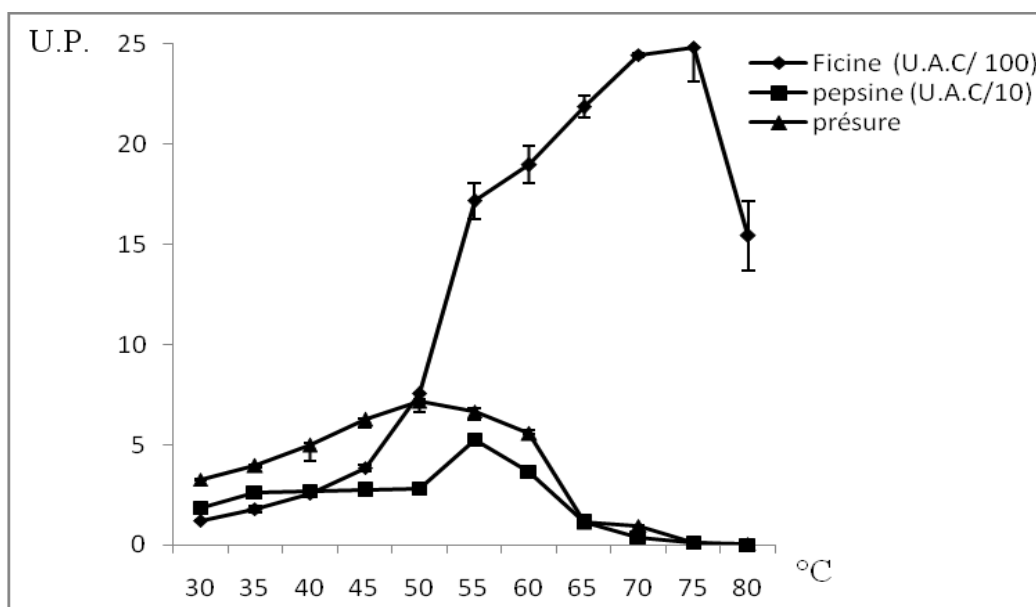
Pour l'extrait de pepsine l'optimum d'activité est observé à pH 5 avec une activité coagulante de 55,92 U.P. puis 46,82 à pH 6 pour se stabiliser à 2,41 à pH 7 et pour la présure animale, elle passe de 4,43 U.P. à pH 5 puis 4,16 U.P. à pH 6 pour arriver à 1,19 U.P. à pH 7. ADOUI, (2007) rapporte que la pepsine de poulet est d'autant plus active que le pH est bas.

D'après ces résultats nous constatons que le pH joue un rôle très important dans la coagulation de lait. En effet, les extraits étudiés montrent un caractère acide (l'optimum d'activité à pH 5).

### II.3.2. Effet de la température

L'effet de la température du lait sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés est déterminé par la mesure de l'activité coagulante à différentes températures d'incubation (de 30 à 80 °C).

La figure 15 montre l'évolution de l'activité coagulante des extraits étudiés par comparaison à la présure en fonction de la température du lait.



**Figure n° 15 :** Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la ficine, de la pepsine de poulet et de la présure.

Nous avons constaté une différence de comportement entre les trois extraits enzymatiques 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 2487,11 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. Ces résultats confirment la grande stabilité thermique de la ficine déclarée par plusieurs auteurs (NASSAR *et al.*, 1987; GRZONKA *et al.*, 2007; FEIJOO-SIOTA *et al.*, 2011 et BEKHI *et al.*, 2013).

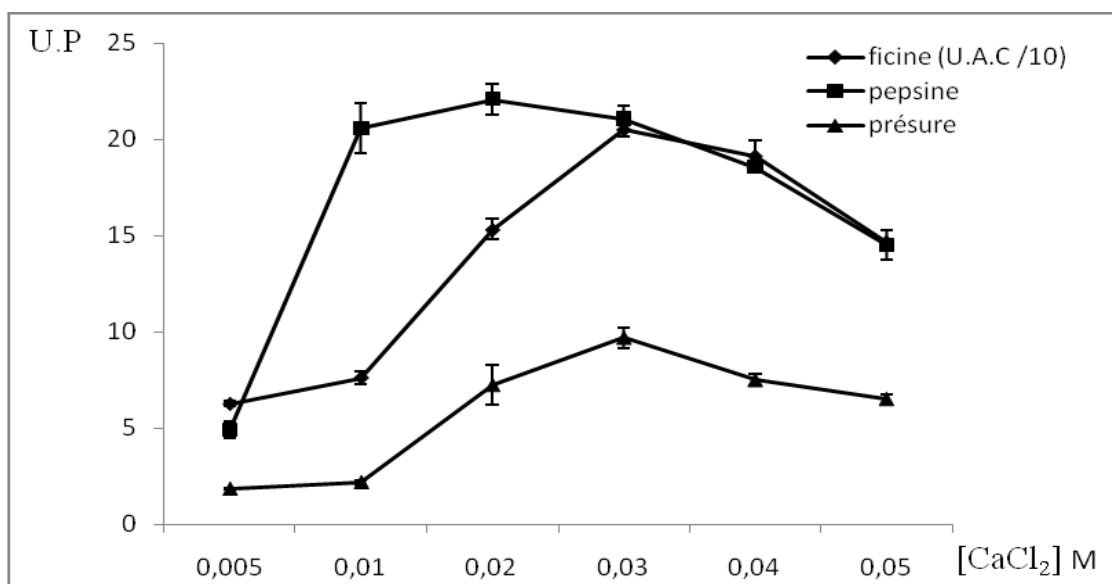
Pour la pepsine et la présure animale l'activité optimale est enregistrée à des températures du lait égales à 55°C et 50°C avec 52,48 U.P. et 7,16 U.P. respectivement, au-delà de ces températures nous avons constaté une baisse d'activité. Les résultats obtenus pour la pepsine sont proches de ceux donnés par ADOUI (2007) évalué à 55°C et supérieurs aux résultats obtenus par NOUANI *et al.*, (2011) estimé à 40°C. L'activité de l'extrait de pepsine diminue au-delà de 55°C. Selon ADOUI (2007) la pepsine est inactivée aux températures dépassant 65°C. NOUANI *et al.*, (2011) ont signalé que la pepsine de poulet est totalement inactivée à 55°C.

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

Pour corriger les variations des teneurs en calcium du lait au cours du stade de lactation ou les modifications de l'équilibre du calcium provoqué par les traitements thermiques, les industries ajoutent du CaCl<sub>2</sub> à une dose de 80 à 200 mg.l<sup>-1</sup> améliorant ainsi l'aptitude à la coagulation du lait (JEANTET *et al.*, 2008). La figure 16 montre l'influence de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

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 205,29 U.P. 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> par litre de lait. En ce qui concerne la pepsine nous remarquons que l'optimum d'activité évalué à 22,07 U.P. est observé à une concentration de 0,02 M. Ce résultat est similaire à celui obtenu par NOUANI *et al.*, (2011) estimé à 0,02 M. Pour la présure l'optimum d'activité (9,69 U.P) est obtenu à 0,03 M.

Pour des concentrations en CaCl<sub>2</sub> supérieures à 0,03M nous remarquons une diminution d'activité coagulante pour les trois extraits enzymatiques.



**Figure n° 16** : Effet de la concentration de CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante de l'extrait de ficine, de pepsine et de présure animale.

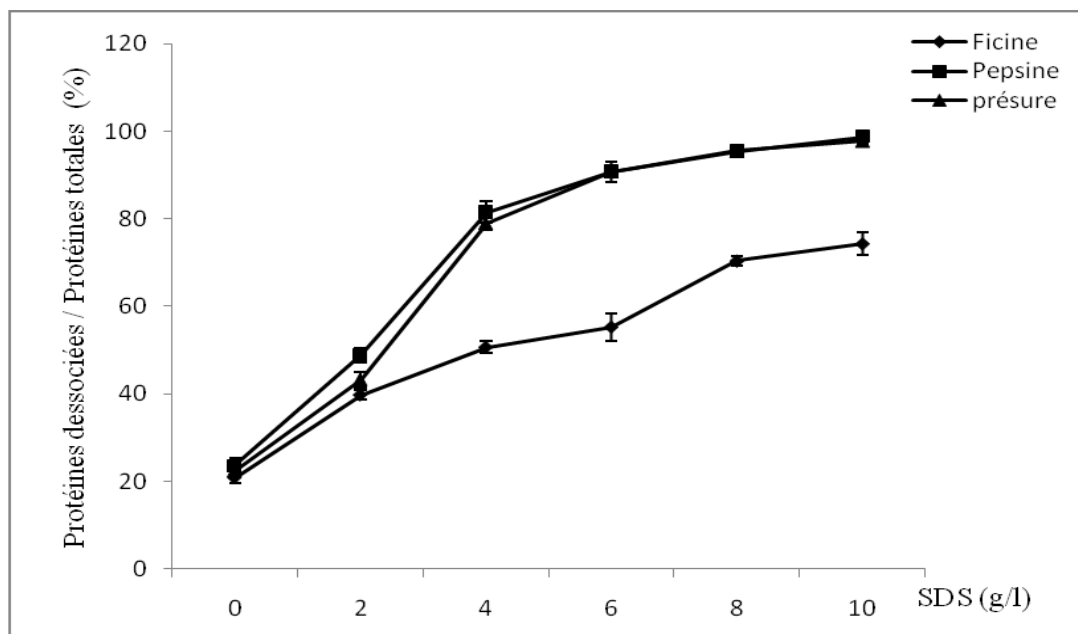
#### II.4. Les interactions impliquées dans le gel obtenu par l'extrait de ficine et de pepsine

L'utilisation d'agents dissociants, permet de mettre en évidence la nature des interactions impliquées dans la formation et le maintien de la structure du réseau protéique du coagulum. Le pourcentage des protéines dissociées par rapport aux protéines totales, reflète l'action de l'agent utilisé sur le réseau protéique, et par conséquent la présence d'interactions spécifiques détruites par cet agent. Les liaisons hydrophobes sont sensibles à l'action des détergents tels que le SDS, les liaisons hydrogènes sont détruites par l'urée et les liaisons calciques sont détruites par les agents chélateurs tel que l'EDTA (LEFEBVRE-CASES *et al.*, 1998 ; BOUGHELLOUT, 2007 ; BENYAHIA-KRID *et al.*, 2010).

Pour l'identification des liaisons impliquées dans la formation et le maintien des gels obtenus par l'extrait de la ficine, l'extrait de la pepsine de poulet et de la présure, nous avons utilisés différents agents dissociant : le SDS pour la destruction des liaisons hydrophobes, l'urée pour les liaisons hydrogène et l'EDTA pour les liaisons calciques.

##### II.4.1. Interactions hydrophobes (dissociés par le SDS)

Le sodium dodecyl sulfate (SDS) agit sur les liaisons hydrophobes des chaînes protéiques ce qui provoque la destruction de ces liaisons. Les taux de dissociation des protéines des gels ficine, pepsine et présure en fonction de la concentration du SDS sont montrés en figure 17.



**Figure n° 17 :** effet de SDS sur les gels présure, pepsine et ficine.

(SDS : concentration du sodium dodecyl sulfate en g/l ; présure : gel issu d'une coagulation par la présure animale ; pepsine : gel issu d'une coagulation par l'extrait de pepsine de poulet ; ficine : gel issu d'une coagulation par l'extrait de ficine).

L'analyse de la variance ANOVA au seuil de signification de 5%, ne montre aucune différence de dissociation entre le gel obtenus par la pepsine de poulet et la présure animale sauf pour la concentration en SDS de 2g/l, par contre pour le gel obtenu avec la ficine le taux de dissociation montre des différences significatives avec le gel pepsine et présure pour toutes les concentrations, exception pour la concentration de 2g/l.

D'après les résultats obtenus nous constatons que le SDS semble avoir un effet important sur les gels pepsine, présure et à moindre degré sur le gel ficine, En effet, à une concentration de 4 g/l de SDS 81,48% des protéines sont dissociées pour le gel pepsine et 78,59% pour le gel présure alors que pour le gel ficine seulement 50,65% des protéines sont dissociées. Pour la concentration de 10g/l de SDS, le taux de dissociation des protéines atteint environ 98,74% pour la pepsine, 97,73% pour la présure et 74,26% pour la ficine.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par BENYAHIA-KRID *et al.*, (2010) et BOUGHELLOUTE, (2007) qui ont étudié l'effet du SDS sur les gels pepsine et présure. Aucune différence significative de taux de dissociation n'a été constatée entre les deux gels au seuil de signification de 5%. En effet, pour une concentration de 10g/l de SDS ; 94,9% des protéines du gel pepsine sont dissociées contre 96,9% pour les protéines du gel présure estimé

par BENYAHIA-KRID *et al.*, (2010) et 99,35% de dissociation pour le gel pepsine et présure obtenu par BOUGHELLOUTE, (2007).

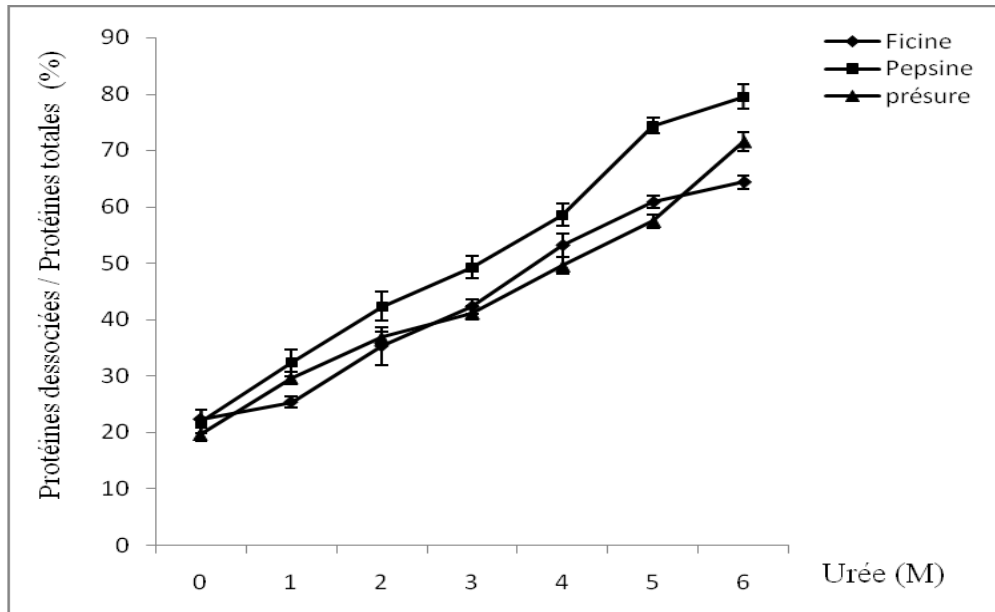
LEFEBVRE-CASES *et al.* (1998) ont étudiés l'effet du SDS sur un gel présure et sur un gel acide. Pour une concentration de SDS de 6 g/l, ils ont constaté une dissociation de 55% dans gel acide contre 90% pour le gel présure.

#### **II.4.2. Interactions hydrogènes (dissociation par l'urée)**

L'utilisation de l'urée comme agent dissociant nous permet de faire une estimation sur l'importance des liaisons hydrogène impliquées dans la formation et le maintien des gels étudiés. La figure 18 montre les résultats obtenus pour le taux de dissociation des protéines des gels ficine, pepsine et présure en fonction de la concentration en urée.

L'urée semble avoir un effet important sur les trois gels étudiés. En effet, à une concentration en urée de 1M le taux de dissociation est de 25,38% pour la ficine, 32,36% pour la pepsine et 29,65% pour la présure, pour atteindre 64,34%, 79,51% et 71,54% pour le gel ficine, pepsine et présure respectivement à une concentration en urée de 6M.

L'analyse de la variance ANOVA au seuil de signification de 5% montre que pour la concentration en urée de 1M le taux de dissociation ne présente aucune différence entre le gel pepsine et présure. Cependant, le gel ficine présente une différence significative avec ces deux derniers. Pour une concentration de 2M la différence est significative entre le gel ficine et le gel pepsine, mais la différence est non significative entre le gel ficine et présure et le gel pepsine et présure. En effet, le taux de dissociation est de 35,31%, 42,31% et 36,80% pour le gel ficine, pepsine et présure respectivement. Pour les concentrations de 3M et 4M, l'ANOVA n'a révélé aucune différence entre le gel ficine et présure qui présentent une différence significative avec le gel pepsine. Pour les concentrations de 5M et 6M nous remarquons que l'analyse statistique n'a révélée aucune différence entre les trois gels étudiés.



**Figure n° 18:** effet de l'urée sur les gels présure, pepsine et ficine.

(Urée : concentration en urée (M) ; Présure : gel issu d'une coagulation par la présure animale ; Pepsine : gel issu d'une coagulation par l'extrait de pepsine de poulet et Ficine : gel issu d'une coagulation par l'extrait de ficine).

Dans des travaux précédents BENYAHIA-KRID *et al.*, (2010), ont rapporté un taux de dissociation des protéines de 61,6% pour le gel présure et 59,2% pour le gel pepsine à une concentration en l'urée de 6M. BOUGHELLOUT (2007) a obtenu un taux de dissociation de 79% pour le gel pepsine et 65% pour le gel présure pour la même concentration en urée. LEFEBVRE-CASES *et al.*, (1998), ont évalué le taux de dissociation à 64% dans le gel présure et 81% dans le gel acide pour une même concentration en urée. De même, dans un autre travail sur l'extrait coagulant de la fleur de cardon, ZIKIOU, (2013) a obtenu un taux de dissociation de 80%.

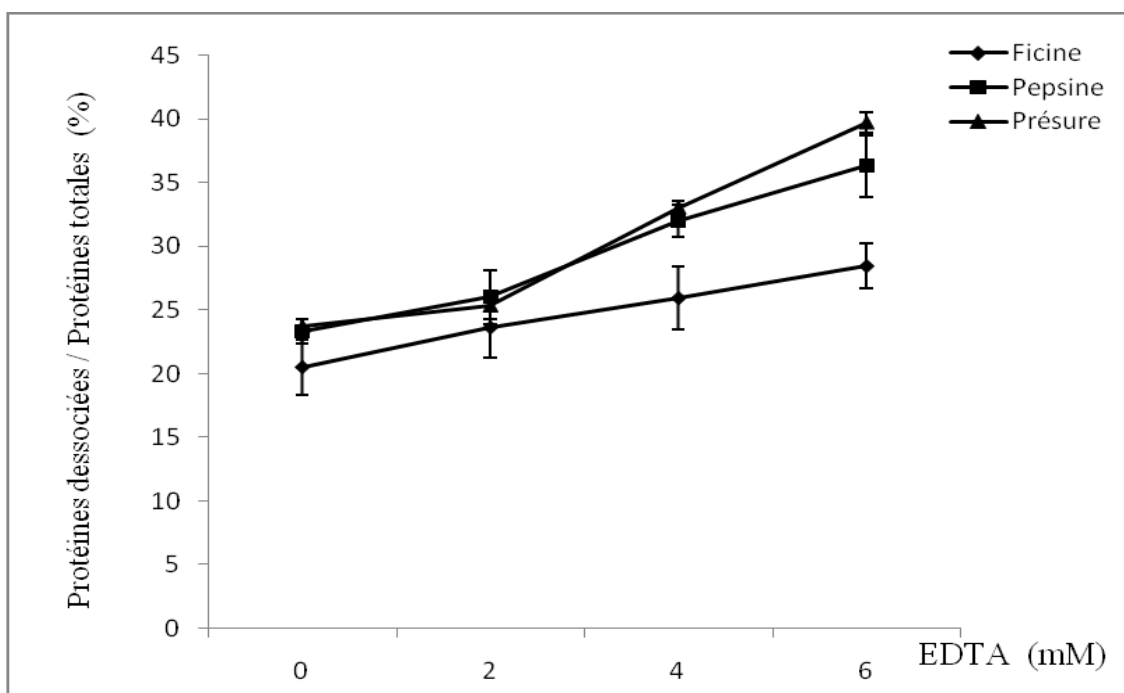
Ces résultats montrent que les liaisons hydrogène sont impliquées dans la formation et le maintien de la structure des gels lactiques à différents degrés. En effet, ces liaisons sont plus importantes dans le gel pepsine et présure comparé à celui de la ficine.

#### II.4.3 Dissociation des protéines par l'EDTA

L'ethylenediamine tetracetic acid (EDTA) est considéré comme un agent chélateur de calcium, son effet sur les gels étudiés est représenté en figure 19.

L'analyse de la variance ANOVA au seuil de signification de 5%, n'a présenté, aucune différence entre les trois gels pour une concentration de 2 mM d'EDTA, aux

concentrations de 4 mM et 6 mM. L'analyse n'a révélé aucune différence entre le taux de dissociation dans le gel pepsine et le gel présure, alors que le gel ficine présente une différence significative avec ces derniers.



**Figure n° 19** : Effet de l'EDTA sur les gels présure, pepsine et ficine.

(EDTA : concentration de l'éthylènediamine tetracetic acide en mM ; Présure : gel issu d'une coagulation par la présure animale ; Pepsine : gel issu d'une coagulation par l'extrait de pepsine de poulet; Ficine : gel issu d'une coagulation par l'extrait de ficine).

En effet le taux de protéines libérées passe de 23,64% pour le gel ficine, 26% pour le gel pepsine et 25,38% pour le gel présure à une concentration en EDTA de 2mM pour atteindre les valeurs de 28,44%, 36,32% et 39,69% pour les gels ficine, pepsine et présure respectivement pour une concentration de 6mM d'EDTA.

Les résultats obtenus pour le gel pepsine et le gel présure à une concentration de 6mM d'EDTA sont proches des résultats obtenus par BENYAHIA-KRID et *al.*, (2010), pour une concentration de 100mM d'EDTA, les auteurs ont obtenu un taux de dissociation de 41,35% pour le gel pepsine et 44,13% pour le gel présure. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus pour le gel ficine (28,44%). LEFEBVRE-CASES et *al.*, (1998), ont évalué le taux de dissociation des protéines à 75,9% pour le gel présure et 26,7% pour le gel acide pour une concentration en EDTA de 2mM.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que :

- les trois types de liaisons (hydrophobes, hydrogène et calciques) contribuent à la formation et au maintien des gels ficine pepsine et présure à différents degrés ;
- Les liaisons hydrophobes dans le gel pepsine et le gel présure sont plus importantes que dans le gel ficine ;
- Les liaisons hydrogène sont plus importantes dans les gels pepsine et présure comparées aux gels ficine ;
- Les liaisons calciques sont plus importantes dans les gels pepsine et présure par rapport aux gels ficine. Ce dernier présente donc les caractéristiques d'un gel acide.

## II.5. Essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type « camembert » par l'utilisation de la ficine ou de la pepsine de poulet

En vue d'étudier la possibilité de substitution de la présure par les extraits étudiés, des essais de fabrication de fromage à pâte molle type « Camembert » ont été effectués à la laiterie SAFILAIT de Constantine.

Afin d'étudier les modifications apportés par les extraits de substitution, nous avons comparé les fromages obtenus avec les fromages témoins fabriqués par l'unité de point de vue sensoriel et physicochimique.

### II.5.1. Caractéristiques physicochimiques du lait utilisé

Le lait utilisé pour la fabrication des fromages est collecté dans la wilaya de Constantine et ses entourages. Le tableau 09 représente la composition physicochimique du lait utilisé.

**Tableau n° 07 :** Composition physicochimique du lait crû utilisé pour la fabrication fromagère.

	Lait crû	Normes AFNOR (1993)
pH	6,6	6,6
Acidité (D°)	16	15 – 18
E.S.T. (%)	12,3	12,3 – 12,5
M.G. (%)	3,8	3,2 – 3,6
E.S.D. (%)	8,5	8,75 – 9
Densité	1,027	1,027 – 1,032



E.S.T. : extrait sec total ; M.G. : matière grasse ; E.S.D. : extrait sec dégraissé = E.S.T.-M.G.

Ces résultats montrent que le lait utilisé dans cette fabrication est conforme aux normes, sauf pour le taux de la matière grasse qui est légèrement supérieur à la norme ce qui influence sur l'extrait sec dégraissé. Cella est due principalement à l'alimentation des vaches durant cette période (mois d'octobre) qui se base principalement sur le foin. Les caractéristiques physicochimiques du lait sont proche de celles rapportés par plusieurs auteurs (AFNOR, 1993 ; VIGNOLA, 2002 ; JEANTET *et al.*, 2008).

## **II.5.2. Paramètres physicochimiques des fromages fabriqués**

### **II.5.2.1. pH**

Un changement du pH affecte profondément les propriétés fonctionnelles de fromage (NOEL et LEFIER, 1991). Ces changements dans les propriétés des fromages se produisent quand le pH passe de 5.4 à 4.9. Cette baisse de pH résulte de plusieurs facteurs, y compris la solubilisation de la majeure partie du phosphate de calcium colloïdal (MEHMET AK, 2003).

Le pH des fromages fabriqués est de 4,88, 5,10 et 5,10 pour le fromage obtenu avec l'extrait de ficine, pepsine et le témoin respectivement. Nous remarquons que le pH des fromages est proche malgré le changement de l'agent coagulant, cela est dû au fait que l'agent coagulant n'influence pas le pH de fromage et que celui-ci est influencé par la composition initiale de lait à l'instant de la coagulation.

### **II.5.2.2. L'extrait sec total**

L'extrait sec total varie selon le type du fromage. Il est influencé par la composition initiale du lait, le type de coagulation ainsi que le type d'égouttage (les fromages à pâte pressée ont un extrait sec totale nettement supérieur à celui des autres fromages) (ALAIS, 1984).

L'extrait sec total des fromages fabriqué est de 64,43%, 55,44% et 55,68% pour le fromage obtenu avec l'extrait de la ficine, l'extrait de la pepsine et le fromage témoin (présure microbienne) respectivement. Cette différence dans l'extrait sec total est due principalement aux types des caillés obtenus. En effet, le caillé obtenu avec la ficine donne des grains de caillés réduits comparées aux grains obtenus dans les coagulum issus de la coagulation par la pepsine de poulet et celui avec la présure microbienne, ce qui rend l'égouttage facile et intensif. Selon JEANTET *et al.*, (2008), le gel présure présente une forte cohésion, élasticité et porosité mais une perméabilité faible, conduisant à un égouttage spontané limité.

### **II.5.3. Le rendement**

Le rendement est la quantité de fromage obtenu à partir d'une quantité indiquée de lait. C'est le paramètre le plus important du point de vue économique dans l'industrie laitière (EMMONS, 1993 ; MIGLIOR *et al.*, 2005 ; HUPPERTZ *et al.*, 2006 ; BITTANTE *et al.*, 2013). Il reflète aussi le bon déroulement des conditions de fabrication.

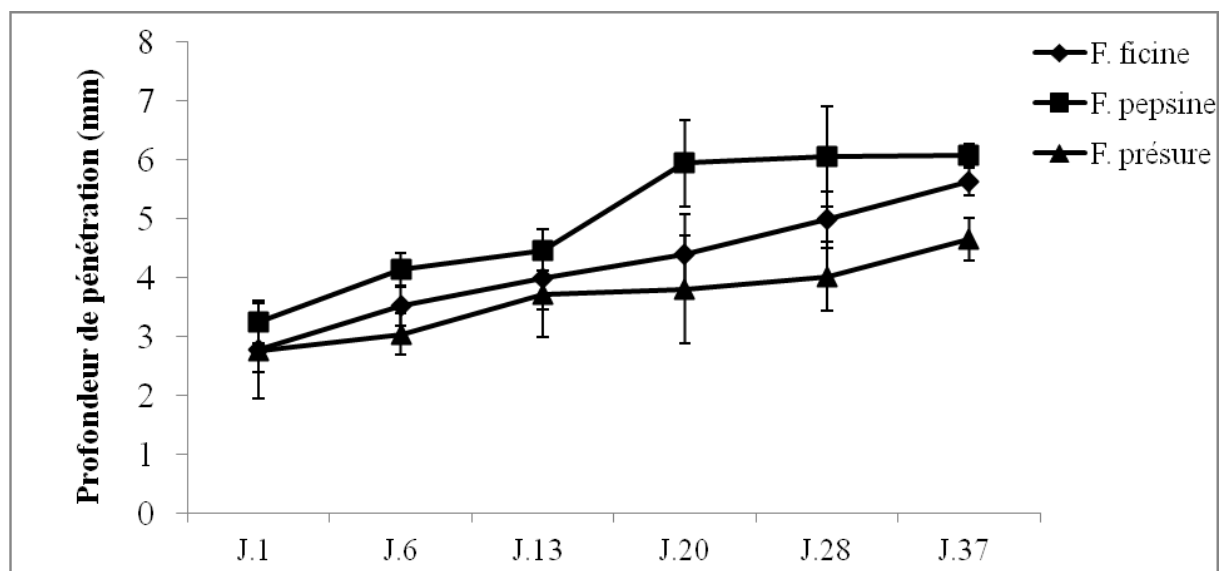
Les rendements obtenus pour les essais réalisés sont : 33,25%, 37,82% et 38,41% pour les fromages issus de la coagulation par l'extrait de ficine, l'extrait de pepsine et la présure microbienne (témoin) respectivement. Cette différence de rendement est due à la différence enregistrée dans la teneur en extrait sec total des trois coagulums obtenus qui sont respectivement : 31,13%, 28,23% et 28,03%. Nous remarquons que le rendement fromager obtenu en utilisant la pepsine de poulet est proche de celui de la présure microbienne (0,59% de différence). Selon STANLEY *et al.*, (1980) l'utilisation de la pepsine de poulet dans la fabrication de fromage Cheddar conduit à un rendement inférieur à celui de la présure. RODNEY et EMSTROM (1988) ont estimé que le rendement fromager obtenu par la pepsine de poulet est inférieur à celui obtenu avec un mélange chymosine-pepsine porcine. Tandis que FINDLAY *et al.*, (1984) ont obtenus les mêmes rendements fromagers par la pepsine de poulet et la présure.

Par ailleurs nous remarquons que le rendement par utilisation de la ficine est largement inférieur à celui de la pepsine et du témoin. En effet, la différence entre le fromage témoin et celui obtenu avec la ficine est de 5,16%. Cette perte de rendement est due à l'agent coagulant (ficine) doté d'une activité protéolytique élevée conduisant à la perte des peptides de masse réduite dans le lactosérum. Ce rendement relativement réduit est signalé par ONER et AKAR, (1993), FADYLOGLU, (2001) et NOUANI *et al.*, (2009).

### **II.5.4. Evolution de la texture des fromages**

La texture est un aspect primaire pour la qualité des fromages. L'aspect des fromages dans la bouche est apprécié avant leur saveur (LAWRENCE *et al.*, 1987). La texture peut être évaluée au moyen de techniques instrumentales ou sensorielles. La méthode instrumentale présente l'avantage d'être corrélée à l'analyse tout en étant facile à mettre en œuvre (LAITIER *et al.*, 2009). 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 fonction de la dureté du fromage (FOX *et al.*, 2000).

Les résultats de la pénétrométrie sont présentés en figure 20. Nous remarquons que la profondeur de pénétration augmente avec la durée d'affinage (âge du fromage), ce qui signifie un ramollissement de la pâte. En effet, la profondeur de pénétration passe de 2,15 mm, 3,6 mm et 2,06 mm au premier jour de fabrication pour atteindre 5,62 mm, 6,07 mm et 4,45 mm au 37<sup>ème</sup> jour d'affinage pour les fromages obtenus avec l'extrait de ficine, l'extrait de pepsine et la présure respectivement.



**Figure n° 20 :** Evolution de la profondeur de pénétration de cône du pénétromètre dans les trois fromages au cours de l'affinage. (F. ficine : fromage issu de la coagulation par l'extrait la ficine; F. PEPSINE : fromage issu de la coagulation par la pepsine du poulet ; F. présure : fromage issu de la coagulation par la présure microbienne ; Profondeur de pénétration : la distance de pénétration du cône en mm ; J.1 : 1<sup>er</sup> jour d'affinage ; J.6 : 6<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.13 : 13<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.20 : 20<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.28 : 28<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.37 : 37<sup>ème</sup> jour d'affinage.

Le ramollissement de la pâte des fromages fabriqués avec la pepsine de poulet est constaté par FINDLAY *et al.*, (1984) et RODNEY et EMSTROM (1988), sur la texture du fromage cheddar. ONER et AKAR, (1993), FACCIA *et al.*, (2012), 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.

L'analyse de la variance ANOVA au seuil de signification 5%, n'a révélée aucune différence significative entre les trois fromages au 1<sup>er</sup> et au 13<sup>ème</sup> jour d'affinage. Pour les 6<sup>ème</sup>, 20<sup>ème</sup>, 28<sup>ème</sup> et 37<sup>ème</sup> jours, la différence est significative. En effet, le fromage témoin (présure microbienne) présente une texture nettement plus ferme que les fromages obtenus avec l'extrait de ficine ou l'extrait de pepsine.

### II.5.5. L'évolution de la protéolyse

La protéolyse est l'événement biochimique principal qui se produit pendant la maturation de la plupart des variétés des fromages. C'est le phénomène le plus important de la phase d'affinage car il affecte à la fois la texture et la saveur des fromages. En effet, la pâte fromagère devienne plus molle et plus onctueuse et il ya production de métabolites qui confèrent un arôme et une saveur particulière aux fromages (FOX *et al.*, 2000 ; Mc SWEENEY et SOUSA, 2000; SOUSA *et al.*, 2001; COURTIN *et al.*, 2002 ; SILVA et MALACATA, 2005 ; O'SULLIVAN *et al.*, 2005 ; HUPPERTZ *et al.*, 2006 ; JEANTET *et al.*, 2008).

Pour mieux déterminer l'impact des différents agents coagulants utilisés, nous avons réalisé un suivi de la protéolyse lors de l'affinage du point de vue qualitatif par électrophorèse UREA-PAGE de la fraction insoluble à pH = 4,6 et quantitatif par dosage des protéines solubles à pH = 4,6 par la méthode de LOWRY *et al.*, 1951.

#### II.5.5.1. Evolution qualitative

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée (UREA-PAGE) est une performante technique qui permet l'évaluation de la protéolyse des caséines (PAVIA *et al.*, 2000 ; VELOSO *et al.*, 2002). En effet, la sensibilité de la technique permet de suivre le comportement électrophorétique des principales protéines du lait à savoir les caséines, ce qui permet de suivre leur dégradation enzymatique au cours de l'affinage est d'apprécier les produits de dégradation qui migrent en fonction de leurs poids et de leurs charges.

Les références bibliographiques mentionnent que les agents coagulants sont les premiers intervenants dans la protéolyse des fromages. Ils attaquent préférentiellement la caséine  $\alpha_{s1}$  en scindant la liaison (Phe23-Phe24), puis ils hydrolysent la caséine- $\beta$ . Cette dernière est néanmoins plus sensible à l'action de plasmides (BERTRAND, 1988, GERMONVILLE, 2012).

En UREA-PAGE, les caséines majeures migrent suivant l'ordre croissant de leurs mobilité comme suit : la caséine  $\beta$  ( $\beta$ -CN), les peptides issus de la dégradation de la caséine  $\beta$ , la caséine  $\alpha_{s1}$  ( $\alpha_{s1}$ -CN) et enfin, les peptides issus de la dégradation de la caséine  $\alpha_{s1}$  :  $\alpha_{s1}$ -CN(f102-199) et  $\alpha_{s1}$ -CN(f24-199) (MEYER *et al.*, 1998 ; MEYER, 2001 ; FALLICO *et al.*, 2005 ; O'SULLIVAN *et al.*, 2005). Les deux fragments issus de la dégradation de la caséine  $\alpha_{s1}$  sont caractérisés par une vitesse de mobilité plus élevée que celle de la caséine  $\alpha_{s1}$  native (FALLICO *et al.*, 2004). La présence de fragment de la caséine- $\alpha_{s1}$  (f24-199) dans les

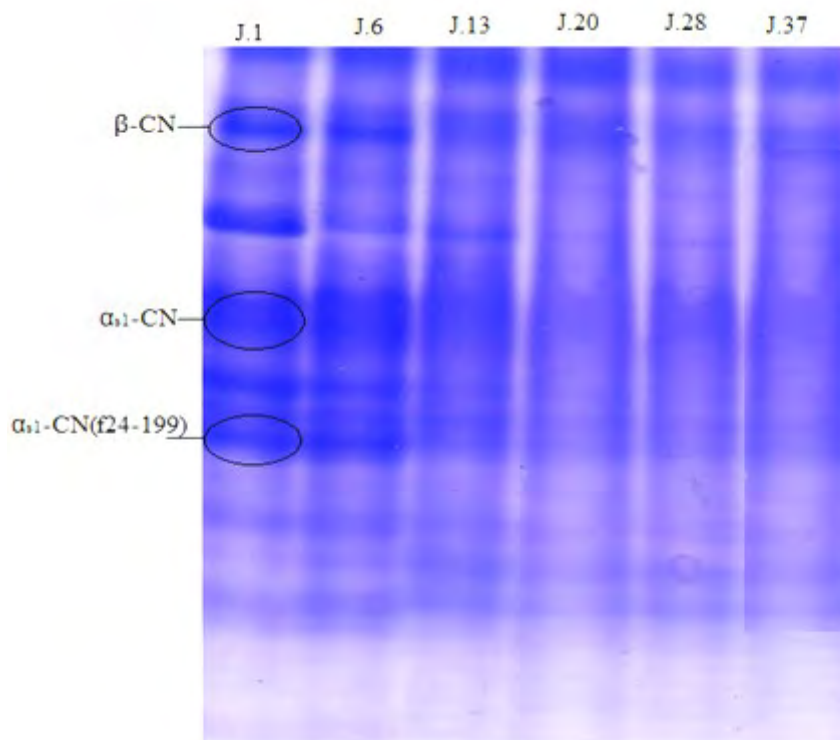
premiers stades de l'affinage semble être liée au ramollissement de la pâte fromagère (CREAMERE et OLSON, 1982).

Les différents électrophorégrammes obtenus pour les trois fromages sont présentés en figures 21 pour la ficine, figure 22 pour la pepsine et figure 23 pour la présure.

Ils montrent la présence de trois bandes intenses au 1<sup>er</sup> jour d'affinage ses bandes présentent : la caséine  $\beta$  ( $\beta$ -CN), la caséine  $\alpha_1$  ( $\alpha_1$ -CN) et le fragment  $\alpha_1$ -CN (f24-199) issu de la dégradation de la caséine  $\alpha_1$ . Néanmoins à partir de 6<sup>ème</sup> jour d'affinage nous remarquons des différences au niveau de la protéolyse entre les trois fromages fabriqués.

Pour le fromage obtenu avec l'extrait de la ficine (figure 21) nous remarquons une importante protéolyse de la caséine  $\alpha_{s1}$  dès le 6<sup>ème</sup> jour d'affinage avec disparition totale à partir du 13<sup>ème</sup> jour d'affinage. Cependant, la dégradation de la caséine- $\beta$  reste lente jusqu'au 28<sup>ème</sup> jour d'affinage où la protéolyse semble être importante. En plus du fragment peptidique  $\alpha_1$ -CN (f24-199), nous avons remarqué l'apparition d'un autre fragment peptidique issu de la dégradation de la caséine  $\alpha_1$  qui est le fragment  $\alpha_1$ -CN (f102-199). Ces deux fragments sont dégradés au fur et à mesure que l'affinage des fromages avance.

L'activité protéolytique de la ficine a été signalée par plusieurs auteurs (WILLIAMS *et al.*, 1968 ; ONER et AKAR, 1993 ; FADYLOGLU, 2001 ; NOUANI *et al.*, 2009). La dégradation intensive de la caséine  $\alpha_{s1}$  qui provoque le ramollissement des fromages (CREAMERE et OLSON, 1982 ; SILVA et MALACATA., 2000), explique les résultats obtenus pour la texture de fromage obtenu avec l'extrait de la ficine.

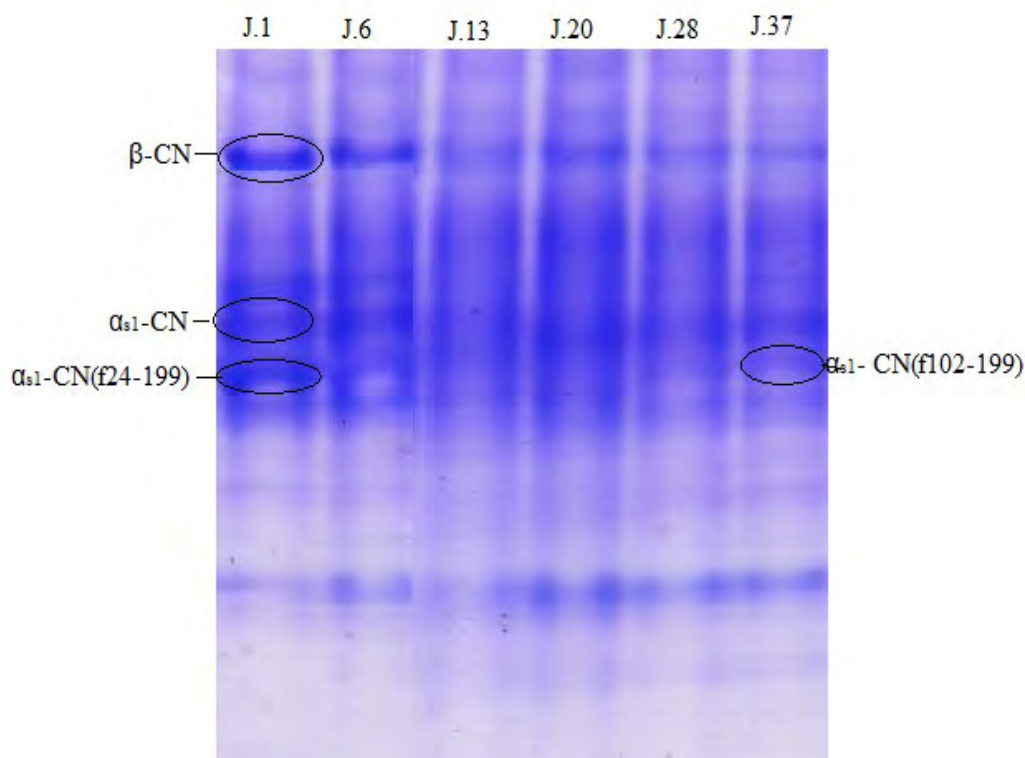


**Figure n° 21 :** profil électrophorétique sur UREA-PAGE des protéines du fromage issu de la coagulation par l'extrait de ficine.

( $\beta$ -CN : caséine  $\beta$  ;  $\alpha_{s1}$ -CN : caséine  $\alpha_{s1}$  ;  $\alpha_{s1}$ -CN (f24-199): fragment issu de la dégradation de la caséine  $\alpha_{s1}$  ; - CN (f102-199) : fragments issus de la dégradation de la caséine  $\alpha_{s1}$ . J.1 : 1<sup>er</sup> jour d'affinage ; J.6 : 6<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.13 : 13<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.20 : 20<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.28 : 28<sup>ème</sup> jour d'affinage et J.37 : 37<sup>ème</sup> jour d'affinage).

Cependant pour le fromage issu de la coagulation avec l'extrait de la pepsine de poulet le profil électrophorétique (figure 22) montre une hydrolyse totale de la caséine  $\alpha_{s1}$  dès le 6<sup>ème</sup> jour d'affinage. En plus du fragment  $\alpha_{s1}$ -CN (f24-199) il y'a apparition d'un autre fragment peptidique issu de la dégradation de la caséine  $\alpha_{s1}$ , il s'agit de  $\alpha_{s1}$ -CN (f102-199), ces deux fragments sont dégradés à leur tour au fur et à mesure que l'affinage du fromage avance.

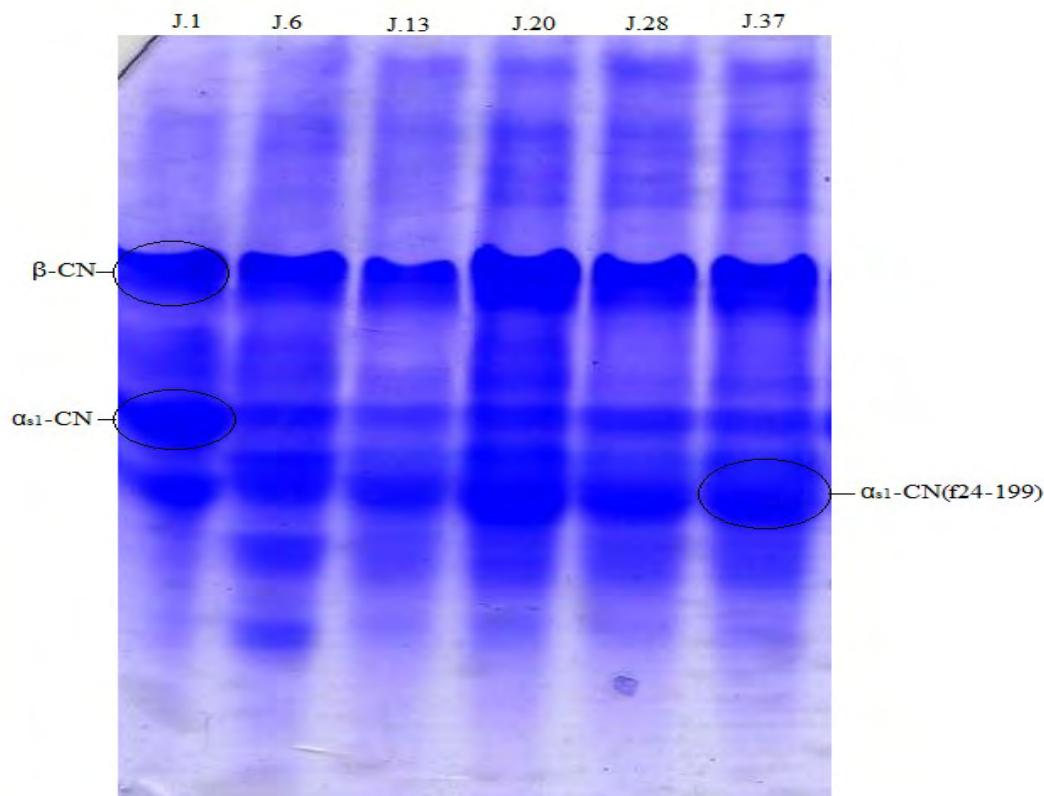
Notons aussi une forte dégradation de la caséine- $\beta$  ce qui montre l'importance de l'action de la pepsine sur la caséine- $\beta$ . L'activité protéolytique relativement excessive de la pepsine de poulet pendant la maturation des fromages a été signalée par plusieurs auteurs (GREEN, 1972 ; FINDLAY *et al.*, 1984 ; RODNEY et EMSTROM, 1988 ZIKIOU, 2013).



**Figure n° 22 :** profil électrophrétique sur UREA-PAGE des protéines du fromage issu de la coagulation par la pepsine du poulet.

( $\beta$ -CN : caséine  $\beta$  ;  $\alpha_1$ -CN : caséine  $\alpha_1$  ;  $\alpha_1$ -CN(f24-199) et  $\alpha_1$ -CN(f102-199) : fragments issus de la dégradation de la caséine  $\alpha_1$ . J.1 : 1<sup>er</sup> jour d'affinage ; J.6 : 6<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.13 : 13<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.20 : 20<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.28 : 28<sup>ème</sup> jour d'affinage et J.37 : 37<sup>ème</sup> jour d'affinage).

Cependant pour le fromage témoin (issu d'une coagulation par une présure d'origine microbienne) (figure 23) nous remarquons une très faible protéolyse des caséines. En effet l'électrophorèse a révélée une dégradation lente de la caséine  $\alpha_1$ , et une stabilité de la caséine  $\beta$  durant les 37 jours du suivi. Cette faible protéolyse explique la fermeté de la pâte et la stabilité de la texture observée lors de l'affinage.



**Figure 23** : profil électrophrétique sur UREA-PAGE des protéines du fromage témoin (issu de la coagulation par une présure microbienne).

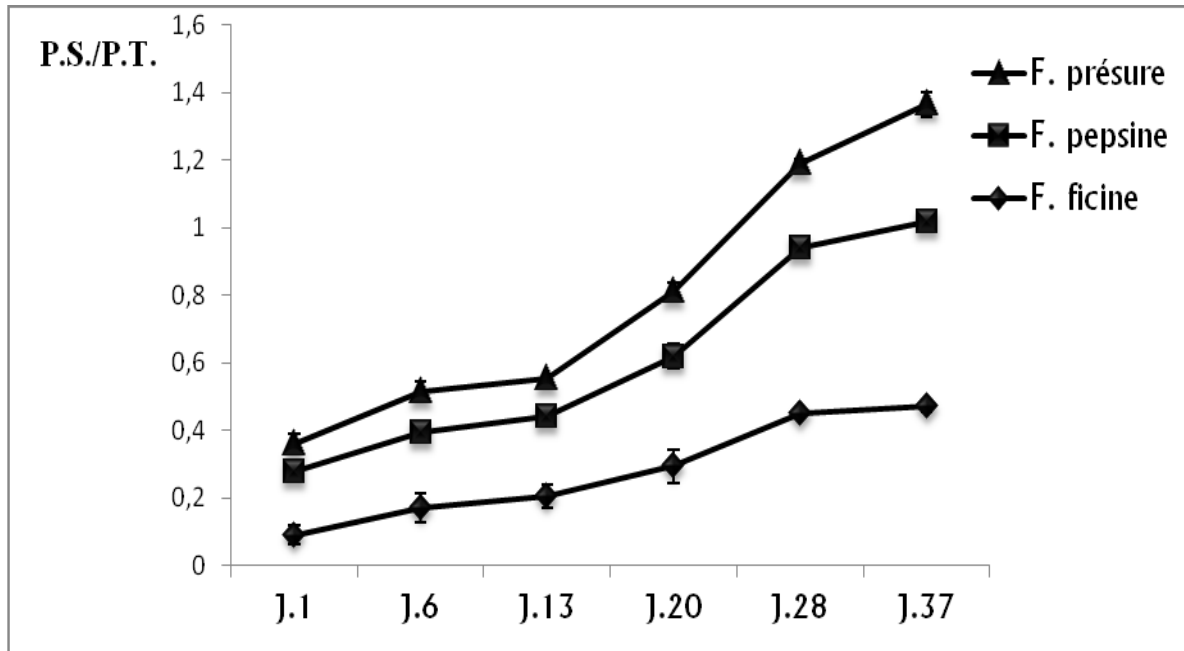
( $\beta$ -CN : caséine  $\beta$  ;  $\alpha$ s1-CN : caséine  $\alpha$ s1 ;  $\alpha$ s1- CN(f24-199) : fragment issu de la dégradation de la caséine  $\alpha$ s1 . J.1 : 1<sup>er</sup> jour d'affinage ; J.6: 6<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.13 : 13<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.20 : 20<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.28 : 28<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.37 : 37<sup>ème</sup> jour d'affinage).

### II.5.5.2. Evolution quantitative

La protéolyse est le principal phénomène biochimique qui se produit lors de l'affinage des fromages, en plus du suivi électrophorétique des fractions protéiques insolubles à pH 4,6 la protéolyse, peut être estimée par le dosage des fractions protéiques solubles à pH 4,6. Cette dernière permet de suivre l'évolution de la fraction protéique soluble à pH 4,6 par rapport aux protéines totales. Cette mesure est souvent utilisée comme un indicateur du degré de maturation des fromages (KUCHROO et FOX 1982 ; LABORDA et RUBIOLO, 1999 ; SOSSA *et al.*, 2001 ; SOUSA et McSWEENEY, 2001 ; VERDINI *et al.*, 2003 ; O'REILLY *et al.*, 2003; GOROSTIZA *et al.*, 2004).

L'évolution du taux des protéines solubles à pH 4,6 par rapport aux protéines totales est présentée en figure 24.





**Figure n° 24 :** Evolution du taux de protéines solubles à pH = 4,6 par rapport aux protéines totales des différents fromages au cours de l'affinage.

(F. ficine : fromage issu de la coagulation par l'extrait de la ficine ; F. pepsine : fromage issu de la coagulation par la pepsine du poulet ; F. présure : fromage issu de la coagulation par la présure microbienne ; P.S./P.T. : rapport protéine solubles à pH 4,6/protéines totales ; J.1 : 1<sup>er</sup> jour d'affinage ; J.6 : 6<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.13 : 13<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.20 : 20<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.28 : 28<sup>ème</sup> jour d'affinage ; J.37 : 37<sup>ème</sup> jour d'affinage).

Les résultats montrent une évolution progressive du taux des protéines solubles par rapport aux protéines totales (P.S./P.T.) pendant l'affinage pour les trois fromages. En effet, ce rapport passe de 9% lors du premier jour d'affinage pour atteindre 47% lors du 37<sup>ème</sup> jour d'affinage pour le fromage issu de la coagulation par l'extrait de la ficine. Alors que le rapport entre les protéines solubles à pH 4,6 et les protéines totales obtenu dans les fromages issus de la coagulation par l'extrait de la pepsine de poulet passe de 19% lors du premier jour d'affinage à 55% lors du 37<sup>ème</sup> jour d'affinage. Cependant dans les fromages témoins, obtenus avec la présure microbienne, ce rapport passe de 8% au premier jour pour atteindre 34,5% au 37<sup>ème</sup> jour d'affinage.

Les rapports P.S./P.T. obtenus dans notre étude sont élevés comparé aux rapports mentionnés par plusieurs auteurs. En effet, TSUDA *et al.*, (1994) ont évalué ce rapport à 18,2% après 50 jour d'affinage du fromage Cheddar. Alors que SOSSA et McSWEENEY, (2001) l'ont estimé à 18% à la fin d'affinage. Cependant MICHALSKI *et al.*, (2003) ont obtenus des rapports de 15% et 17% au bout de 30 jours d'affinage. Tandis que

O'SULLIVAN *et al.* (2005), ont obtenus une valeur de 18.2% et 20% pour les fromages (camembert) issus de la coagulation par la présure de veau et les fromages obtenus par l'extrait coagulant des gousses de la Grandine respectivement.

### **II.5.6. Evolution des caractéristiques organoleptiques**

Le type de coagulation influe sur la qualité sensorielle finale du fromage (GALLARDO-ESCAMELLA, 2005). Selon WALSTRA *et al.*, (2006), l'agent coagulant intervient dans la détermination des caractéristiques sensorielles finales des fromages.

Afin de déterminer les différences éventuelles qui peuvent exister entre les trois fromages fabriqués par les agents coagulants étudiés, nous avons réalisé une série d'analyses sensorielles pour suivre l'évolution des caractères sensoriels pendant l'affinage (du 1<sup>er</sup> jour jusqu'au 37<sup>ème</sup> jour).

#### **II.5.6.1. Le test de classement par rang**

Le dégustateur est invité à classer les échantillons selon l'acceptabilité sans donner d'égalité. Ce test à deux objectifs, le premier est de classer les fromages selon la préférence et le second est de savoir si les dégustateurs peuvent discerner une différence entre les fromages.

L'analyse de la variance au seuil de signification de 5% montre que la différence est non significative entre les trois fromages jusqu'au 13<sup>ème</sup> jour d'affinage. Exception pour le fromage issu de la coagulation par la pepsine et le fromage témoin. Cette différence devient non significative au 37<sup>ème</sup> jour d'affinage. Cependant la différence est non significative entre le fromage issu de la coagulation par l'extrait de la ficine et le fromage témoin d'un côté et de l'autre côté entre le fromage issu de la coagulation par l'extrait de la pepsine et le fromage issu de la coagulation par l'extrait de la ficine. Ce résultat peut être expliqué par le fait que le fromage issu de la coagulation par l'extrait de la ficine présente des caractéristiques sensorielles intermédiaires.

Les dégustateurs ont classé les fromages par l'ordre d'appréciation suivant : le fromage témoin (issu de la coagulation par la présure microbienne) suivi de fromage issu de la coagulation par l'extrait de la ficine puis le fromage issu de coagulation par la pepsine du poulet.

#### **II.5.6.2. Le test d'intensité**

Les résultats de l'analyse de la variance ANOVA pour le test d'intensité sont présentés dans les tableaux de l'annexe.

L'analyse de la variance ANOVA au seuil de signification de 5%, n'a donnée aucune différence significative entre les trois fromages fabriqués pour la plupart des attributs. Cependant des différences de goût (amertume) sont perçues dès le 1<sup>er</sup> jour pour les fromages obtenus avec la pepsine de poulet et dès le 13<sup>ème</sup> jour pour les fromages obtenu avec la ficine. Pour la texture (texture lisse et moelleuse) les différences sont perçues dès le 6<sup>ème</sup> jour d'affinage pour les fromages obtenus avec la pepsine et dès le 13<sup>ème</sup> jour pour les fromages issus de la coagulation par la ficine.

Les figures suivantes représentent les profils sensoriels obtenus à différentes périodes de d'affinage des fromages.

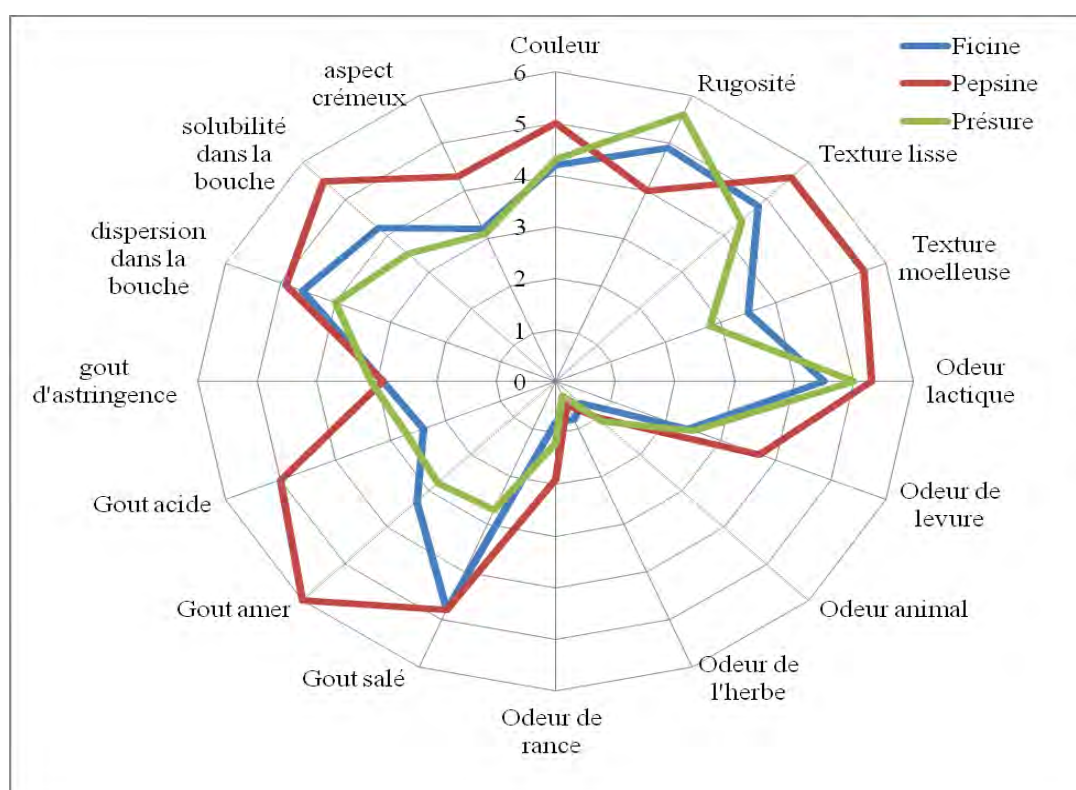


Figure n° 25 : Profil sensoriel des trois fromages au 1<sup>er</sup> jour de fabrication.

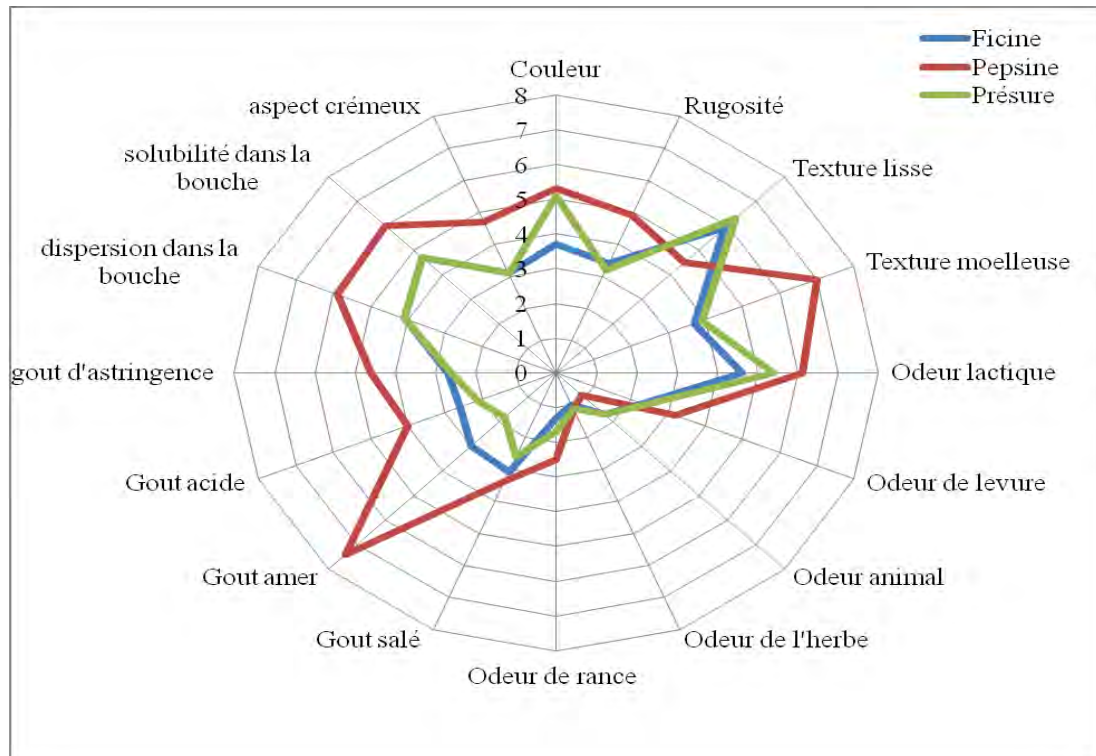


Figure n° 26 : Profil sensoriel des trois fromages au 6<sup>ème</sup> jour d'affinage.

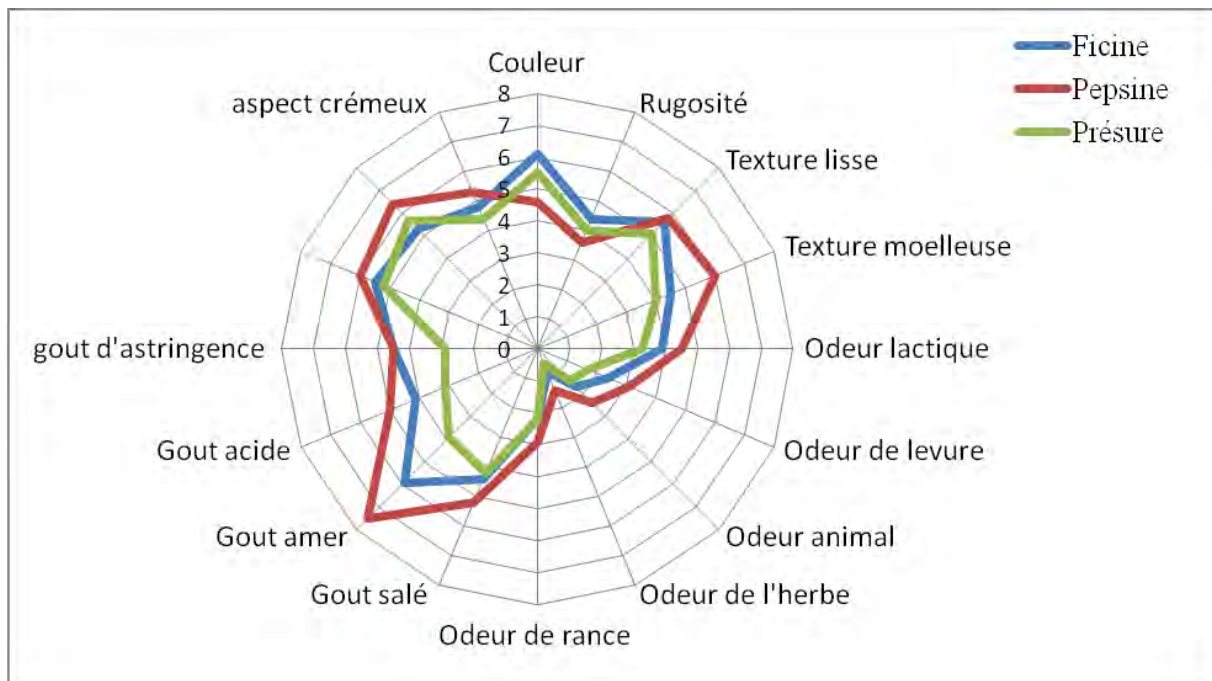


Figure n° 27 : Profil sensoriel des trois fromages au 13<sup>ème</sup> jour d'affinage.

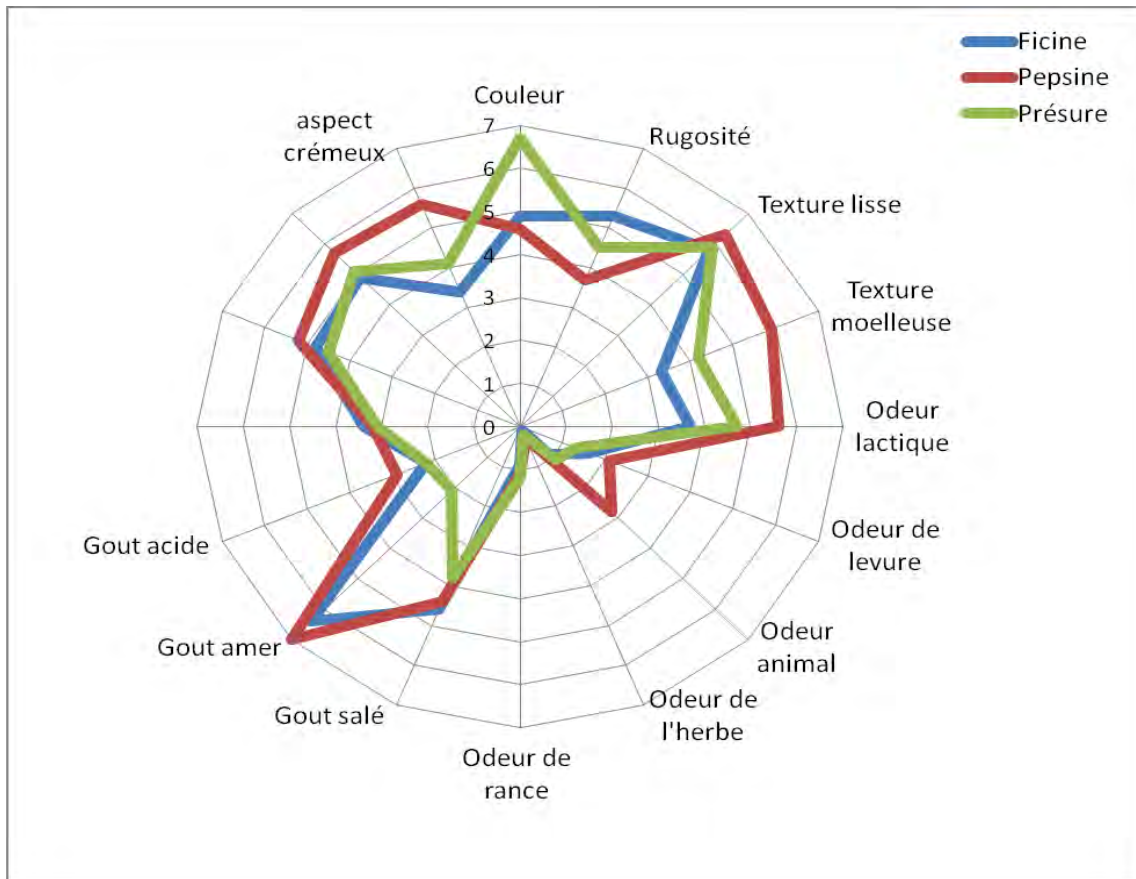


Figure n° 28 : Profil sensoriel des trois fromages au 20<sup>ème</sup> jour d'affinage.

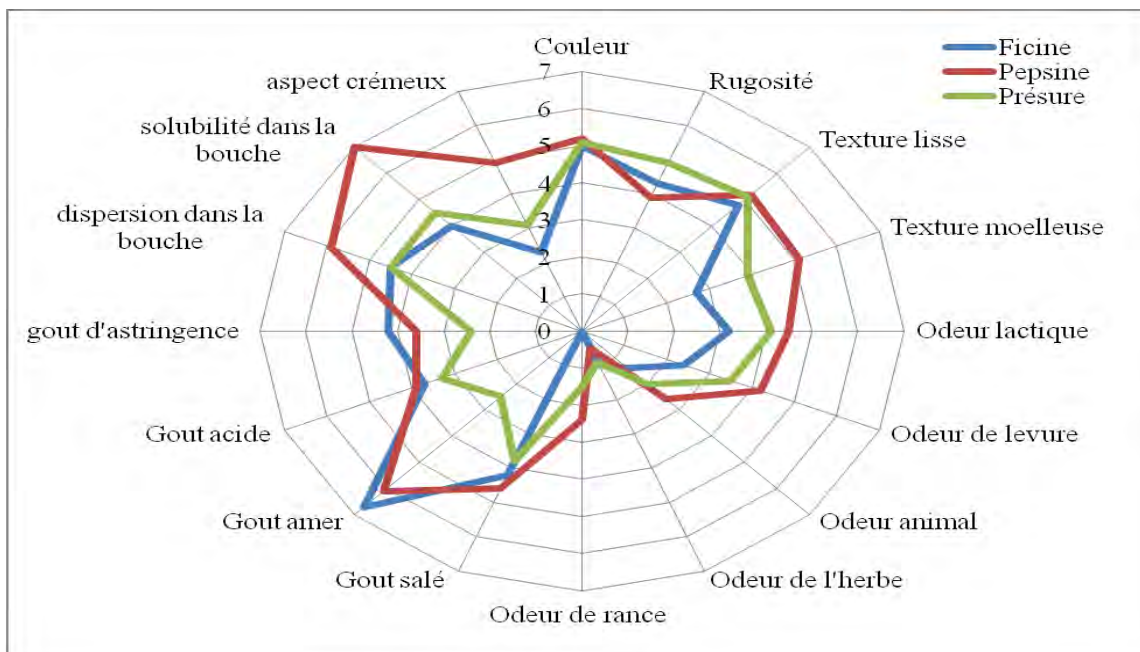
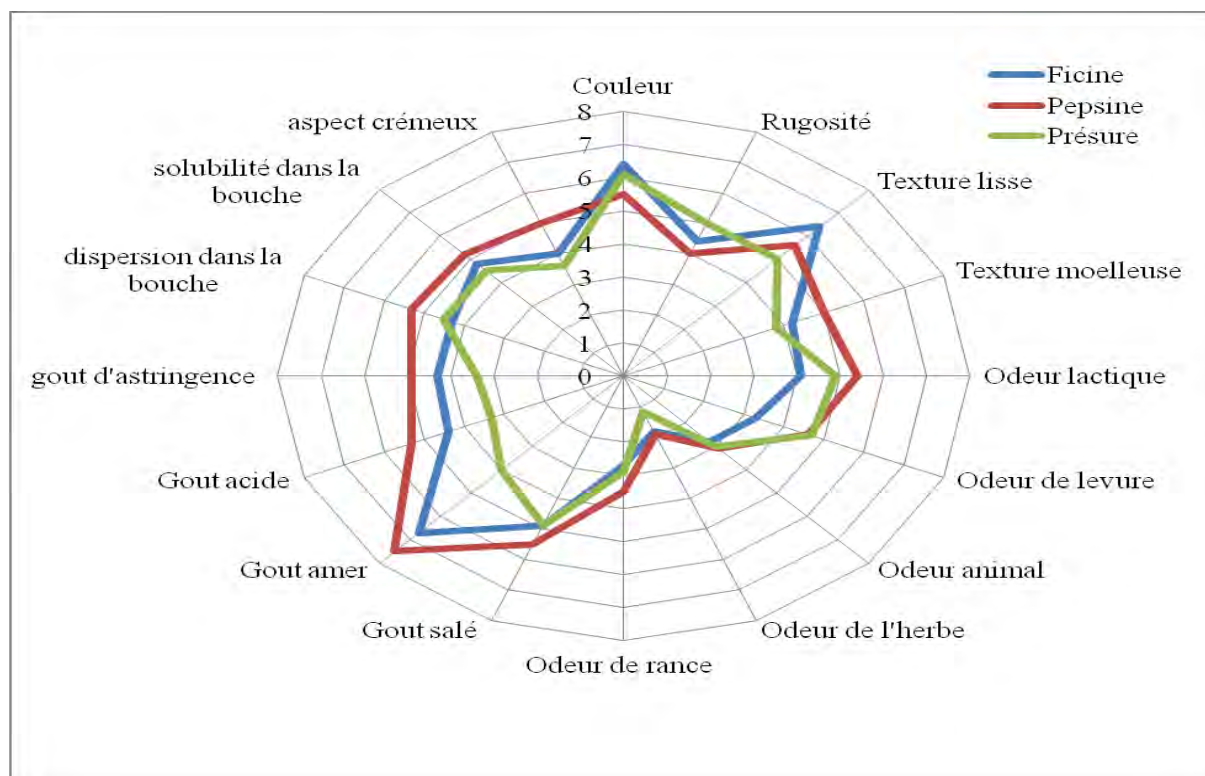


Figure n° 29 : Profil sensoriel des trois fromages au 28<sup>ème</sup> jour d'affinage.



**Figure n° 30 :** Profil sensoriel des trois fromages au 37<sup>ème</sup> jour d'affinage.

### ➤ La texture

Pour la texture des fromages obtenus avec l'extrait de la ficine, nous avons remarqué que les dégustateurs ont apprécié sa texture lisse qui est proche de celle du témoin, cette texture lisse est due à la nature du caillé obtenu qui est caractérisé par de grains de taille réduite. Dès le 13<sup>ème</sup> jour d'affinage la pâte devient molle.

Pour la texture des fromages obtenus avec l'extrait de pepsine, les dégustateurs ont constaté que la pâte était molle et qu'elle perd sa fermeté plus rapidement que les deux autres fromages avec l'avancement du temps d'affinage. Ce résultat a été constaté par STANLEY *et al.*, (1980) et FINDLAY *et al.*, (1984) dans leurs travaux sur le fromage cheddar, ainsi que par ZIKIOU, (2013) dans ses travaux sur le fromage à pâte molle type « Camembert » fabriqué avec la pepsine.

Par contre, le fromage témoin est caractérisé par une pâte homogène et plus au moins lisse et présente une texture plus ferme. En effet, le développement de la texture de ce fromage pendant l'affinage est trop lent. Cette stabilité est due à la faible activité

protéolytique que possède la présure microbienne ainsi qu'à la spécificité de son action sur les caséines.

➤ **Le goût**

Les dégustateurs ont jugé que le goût des fromages obtenus par l'extrait de ficine acceptable. Il est moyennement salé et acide avec un goût astringent relativement toléré, cependant dès le 13<sup>ème</sup> jour ils ont constaté un léger arrière goût d'amertume qui se développe avec le temps d'affinage. Cette caractéristique a été constatée par plusieurs auteurs dans les fromages fabriqués avec la ficine (FADYLOGLU, 2001 ; ONER et AKAR, 1993).

Concernent les fromages issus de la coagulation par l'extrait de la pepsine de poulet, les dégustateurs l'ont jugé moyennement salé et acide mais avec une amertume très prononcée dès le 6<sup>ème</sup> jour d'affinage. Cette amertume peut être expliquée par l'activité protéolytique élevée de la pepsine et la non spécificité de son action sur les caséines ainsi que la quantité de la pepsine rajoutée au début de la fabrication. Cette amertume a été constatée par plusieurs auteurs dans les fromages Cheddar fabriqués avec la pepsine de poulet (LEMIEUX et SIMARD, 1991 ; FINDLAY *et al.*, 1984; STANLEY *et al.*, 1980).

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

Le fromage témoin (issus de la coagulation par la présure microbienne), présente une bonne stabilité de goût durant toutes les périodes d'affinage. En effet, il est considéré moyennement salé et acide avec une absence totale d'amertume même après 37 jours d'affinage.

➤ **La couleur et l'odeur**

Du point de vu couleur et odeur, l'analyse de la variance a montré qu'il n'existe aucune différence entre les trois fromages obtenus avec différents agents coagulants (ficine, pepsine et présure microbienne).

Au terme de cette étude sensorielle nous pouvons constater que les extraits étudiés (ficine et pepsine), présentent des avantages qui leur permettent de remplacer la présure dans la fabrication des fromages à pâte molle type « camembert ». En effet, les paramètres couleur et l'odeur et à moindre degré goût et texture répondent aux exigences requises pour ce type de fromage et sont proches de ceux du fromage témoin (présure microbienne).

*Conclusion et  
perspectives*



Notre étude répond aux objectifs de l'équipe de recherche T.E.P.A. (L.N.T.A. de l'I.N.A.T.A.A) par la contribution à la recherche des succédanés de présure utilisables industriellement. Nous avons étudié la possibilité de substituer la présure par l'extrait brut de ficine (d'origine végétale) et l'extrait clarifié de la pepsine de poulet (d'origine animale). Ces deux extraits sont utilisés dans les pratiques traditionnelles pour la fabrication des fromages (*Agugli* pour la ficine et *Takammérit* pour la pepsine).

Ce travail visait la caractérisation des deux agents coagulants proposés et tester la possibilité de leur utilisation dans la fabrication de fromages. Notre démarche a comporté deux étapes. Premièrement la récupération des matières premières renfermant les systèmes enzymatiques recherchés, l'extraction des enzymes (ficine et pepsine de poulet) et la caractérisation des extraits de point de vue activité et force coagulante et conditions optimales d'activité (température, pH et  $[CaCl_2]$ ). En outre, l'étude de l'activité protéolytique et des interactions impliquées dans la formation des gels issus de la coagulation par les extraits étudiées par comparaison à la présure animale a été envisagée.

Deuxièmement, nous avons tenté une fabrication de fromage à pâte molle type « Camembert » au niveau industriel en substituant l'agent utilisé par l'industrie (présure microbienne) par l'extrait de ficine ou de pepsine en suivant le même diagramme de fabrication. Pendant cette étape, nous avons étudié le rendement fromager, suivi l'évolution de la protéolyse et situé les caractéristiques organoleptiques des fromages obtenus depuis la fabrication jusqu'au 37<sup>ème</sup> jour d'affinage par comparaison aux fromages témoins (fabriqué avec l'agent coagulant microbien).

L'extraction nous a permis d'avoir des extraits enzymatiques de ficine et de pepsine de poulet dont les caractéristiques sont respectivement les suivantes.

- une activité coagulante de 121,09 U.P., une force coagulante de 1/42059,76 et une teneur en protéine de 89,31 mg/ml. Le rendement d'extraction est estimé à 71,42. Son activité protéolytique est de 469,7  $\mu$ g d'équivalent tyrosine/ml d'extrait enzymatique estimée 13 fois plus que celle de la présure évaluée à 35,75  $\mu$ g/ml.

- une activité coagulante de 18,61 U.P, une force coagulante de 1/6041,64 avec un rendement d'extraction de 84,43%. Son activité protéolytique est estimée à 117  $\mu$ g/ml qui est de 3 fois plus que celle de la présure animale.

- L'étude des conditions optimales d'activité a montré des différences de comportement entre les trois extraits enzymatiques. Le pH optimal de coagulation pour l'extrait de ficine et de pepsine est le même que celui de la présure évalué à 5. Pour la température optimale de coagulation, les résultats obtenus révèlent une différence de comportement entre les trois enzymes. En effet, l'optimum d'activité pour la ficine est obtenu à une température de 75°C, la pepsine à 55°C et la présure à 50°C. Concernant la concentration en chlorure de calcium, nous avons remarqué que l'optimum pour la ficine et la présure est de 0,03 M, alors que pour la pepsine il est de 0,02 M.

- L'étude des interactions impliquées dans la formation et le maintien des gels par utilisation d'agents dissociants a montré l'importance des liaisons hydrophobes, puis des liaisons hydrogènes suivi des liaisons calciques. Les liaisons hydrophobes hydrogènes et calciques sont plus abondantes dans les gels pepsine et présure comparées aux gels ficine.

- L'essai de fabrication d'un fromage à pâte molle type « Camembert » par utilisation des extraits de ficine et de pepsine a donné un rendement plus faible pour les deux extraits comparé à celui de la présure microbienne (33,25%, 37,82% et 38,41% pour les fromages ficine, pepsine et présure microbienne<sup>o</sup>). Les fromages obtenus présentent des caractéristiques organoleptiques assez proches de celles du fromage témoin, avec des distinctions quant à la texture encore plus molle et le goût assez amer. L'ordre de préférence des fromages par les dégustateurs est : le fromage témoin, le fromage à l'extrait de la ficine puis le fromage à la pepsine. La protéolyse est plus avancée dans les fromages obtenus avec la pepsine et la ficine que dans les fromages témoins.

Pour conclure, nous pouvons dire que les résultats obtenus semblent intéressants d'autant qu'ils montrent la possibilité d'obtention des extraits enzymatiques capables de remplacer la présure dans l'industrie fromagère en partant des pratiques traditionnelles. Ces extraits sont obtenus à partir de matières assez disponibles et inexploitées.

Cependant il est intéressant de poursuivre ce travail par :

- L'étude des paramètres influençant l'extraction de ces deux enzymes afin d'améliorer la qualité des extraits et le rendement d'extraction;
- La purification de ces enzymes afin d'envisager d'autres utilisations ;
- La possibilité d'utilisation des extraits de la ficine et de la pepsine dans la fabrication pour d'autres types de fromages ;

- L'étude de leur effet sur la qualité des fromages obtenus par la caractérisation des produits de dégradation obtenus lors de l'affinage.

*Références  
bibliographiques*

**ABRAHAM S., CACHONA R., COLASC B., FERONA G., DECONINCKA J., (2006).** Eh and pH gradients in Camembert cheese during ripening: Measurements using microelectrodes and correlations with texture. *International Dairy Journal*.

**ADOUI F., (2007).** Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir des proventricules de poulet. Mémoire magister. Univ. Mentouri Constantine. 64p.

**AFNOR, (1993).** *Contrôle de la qualité des produits alimentaires : lait et produits laitiers : analyses physicochimiques*. Paris La Défense : AFNOR, 4e éd., 581 p.

**AGRAWAL, A. A. et KONNO K., (2004).** Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40: 311–331.

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

**ALAIS C., (1984).** Science du lait. Principes des techniques laitières. Ed. SEPAIC, 4ème édition, 814p.

**ALAIS, C., (1971).** Les enzymes coagulantes, les techniques laitières. Vol 79 : 719 P.

**ALAMAREOT J. (1982)** Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaire, édition du point vétérinaire-Alfort. 289p

**AMINOT J., FOURNIER S., LEBEUF Y., PAQUIN P., et SIMPSON R., (2002).** Composition, propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait *in* Sciences et technologies du lait. Ecolepolytechnique de Montréal. pp .1-69.

**ANDREN A. (2002).** Rennets and coagulants pp281-286 *in* Encyclopedia of Dairy Science. Roginski H.,Fuquay J. Fox P. Elsevier

**ANDREWS A.T., (1983).** Proteinases in normal bovine milk and their action on the caseins. *J. Dairy Res.* 50 : 45–55.

**AZARKAN M., MATAGN A., WATTIEZ R., BOLLE L., VANDENAMEELE J., BAEYENS-Volant D., (2011).** Selective and reversible thiol-pegylation, an effective

approach for purification, and characterization of five fully active ficin (iso)forms from *Ficus carica* latex. *Phytochemistry* 72, 1718–1731.

**BABY J. et RAJ S. J., (2011).** Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn—An overview. *International Journal of PharmTech Research.* 3: pp 08-12.

**BAH S, PAULSEN B.S., DIALLO D., JOHANSEN H. T., (2006).** Characterization of cysteine proteases in Malian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*; 107:189–198.

**BANGA-MBOKO H., GODEAU J.M., DRION P.V., EL AMIRI B., DRION V., PERENYI Z., SOUSA N.M., BECKERS J.F., (2002).** Evaluation de l'utilisation du pepsinogène sanguin comme bio marqueur de l'intégrité de la muqueuse gastrique chez le porc. *Ann. Méd. Vét.*, 146, 339-346.

**BARBANO D. M., et RASMUSSEN, R. R., (1992).** Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants *J.dairy Sci.* 75:1-12.

**BARS – BAILY SL, BAILY JD et BRUGERE. (1979).** Hygiène et industrie des aliments. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse. 23 chemin des Capelle, F – 31075 Toulouse CODEX 3.P.p.12.

**BEKHIT A. EL-D. A., HOPKINS D. L., GEESINK G., BEKHIT A. A., PHILIP F., (2013).** Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 89p.

**BENYAHIA-KRID F.A., ATTIA H., ZIDOUNE M. N., (2010).** Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: Interactions and microstructure. *J. of Agriculture, Biotechnology and Ecology*, vol.3, pp: 75-86.

**BENYAHIA-KRID F.A., ATTIA H., ZIDOUNE M.N., (2010).** Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: Interactions and microstructure. *J. of Agriculture, Biotechnology and Ecology*, vol.3, pp: 75-86.

**BERRIDGE N.J., (1955).** Purification and assay of rennin. *Methods in enzymology.* Ed. Perlmann G.E. and Loran Acad. Press Inc., New York. Vol. 2. 69-77

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

**BITTANTE G., CIPOLAT-GOTET C., et CECCHINATO A., (2013).** Genetic parameters of different measures of cheese yield and milk nutrient recovery from an individual model cheese-manufacturing process. *J. Dairy Sci.* 96 :7966–7979

**BOHAK, Z. (1969).** Purification and characterisation of chicken pepsinogen and chicken pepsin *J. biological chemistry.* Vol. 244, N°.17: p.4638-4648.

**BOHAK, Z., (1970).** Chicken pepsinogen and chicken pepsin. In: *Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes.* Ed., G. E. Perlmann and L. Lorand, Acad. Press Inc., New York, V. 19, p.347-358, 1042 p.

**BOTTON B., BRETTON A., FEVR M., GAUTHIER P. H., LARPENT J.P., RAYMAND P., SANGHIER J.J., NAYSSIER Y. et VEAU P., (1990).** Les moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Edition Masson (2eme édition).

**BOUDIER, J.F., (1974).** Présure et succédané de la présure, série de synthèse bibliographique. *Ed Tech et Doc., APRIA, France.* 873p.

**BOUGHELLOUT H., (2007).** Coagulation du lait par la pepsine du poulet. Mémoire magister, université Mentouriconstantine, 69p.

**BRULE G., LENOIR J., et REMEUF F., (1997).** La micelle de caséine et la coagulation du lait. *In Le fromage.* ECK A., et GILLIS J.-C. Lavoisier, Tec & Doc. Paris. pp :7-39.

**BRUNO MA., TREJO SA., AVILES XF., CAFFINI NO., LOPEZ LMI., (2006).** Isolation and characterization of hyeronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Prot J.* 25: 224–231.

**CAYOT P., et LORIENT D., (1998).** Structures et techno-fonctions des protéines du lait. *Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris,* 363 p.

**CHEFTEL J.C. et CHEFTEL H., (1977).** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Vol : 1. *Tech et Doc. Lavoisier.* 381p.

**CHOLET O., 2006.** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Thèse doctorat, Institut National Agronomique Paris, Grignon, 192 p.

**CODEX STAN 276-1973, (2010).** NORME CODEX POUR LE CAMEMBERT. Lait et produits laitiers (2ème édition). 5p

**COURTIN P., NARDI M., WEGMANN U., JOUTSJOKI V., OGIER J.C., GRIPONA J.C., PALVA A., HENRICH B., MONNET V., (2002).** Accelerating cheese proteolysis by enriching *Lactococcus lactis* proteolytic system with lactobacilli peptidases. *International Dairy Journal* 12: 447–454.

**CREAMER L.K. et OLSON N.F., (1982).** Reological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47, 631-636, 646.

**CREVIEU-GABRIEL I., GOMEZ J., CAFFIN J-P., CARRE B., (1999).** Comparison of pig and chicken pepsins for protein hydrolysis. *Nutr. Dev.* 39. 443-454.

**DALGLEISH D.G. et HOLT C., (1988).** A Geometrical model to describe the initial aggregation of partly renneted caseinmicelles. *Journal of colloid and interface science*, vol 123, N° 1

**DALGLEISH D.G., (1997).** The enzymatic coagulation of milk In: *Advanced in dairy chemistry -1, proteins*, Ed., P.F.Fox , Blackie and Son Ltd,p.579-619.

**DALGLEISH, D.G., (1993).** The enzymatic coagulation of milk. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 2nd edn (ed. P.F. FOX), vol. 1, pp. 69–100. Chapman & Hall, London.

**DAMERVAL C., VIENNE D., ZIVY M., TARROUX P. et VINCENS P., (1993).** Electrophorèse bidimensionnelle des protéines, *Biofutur*. 123 : 3-10.

**DEBRY G., (2001).** Lait, Nutrition et santé. . Jean-Pierre Poulin « Représentation sociales du lait ». Ed : Tec et Doc. Paris. Lavoisier., 498p.

**DEFLEURES M., (1980).** Accident et défaut des fromages à pâte molle remèdes à apporter. Publication de la société Lacto – France.

**DESMAZEAUD M. et SPINLER E., (1997).** Laits et produits laitiers *in* LARRETAGARDE V. *Enzymes en agroalimentaires*. Ed. Tech & Doc, Lavoisier.

**DEVARAJ K.B., GOWDA LALITHA R. et PRAKASH V., (2008b).** An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.) *Phytochemistry* 69: 647–655.



**DEVARAJ K.B., KUMAR P.R. et PRAKASH, V., (2008a).** Purification, characterization and solvent induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11417–11423,

**DEVARAJ K.B., PARIGI RAMESH KUMAR, PRAKASH V., (2011).** Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. *Process Biochemistry* 46. 458–464.

**DICTIONARY OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, (2009).** Second Edition Compiled and edited by the International Food Information Service. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication. 447 P.

**DONTA S.T. et VAN VUNAKIS H., (1970).** Chicken pepsinogens *in* *Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes.* Ed., Perlmann G.E. and Lorand L, Acad.Press Inc., New York Volume 19, 358-363, 1042 P.

**ECK A. et GILLIS JC., (2006).** Le fromage. *Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, 3eme édition, Paris. P.874.*

**ECK A., (1987).** Le fromage, *Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, 2eme édition, Paris. P. 529.*

**ECK A., (1990).** Le fromage, *Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, 2eme édition, paris. P. 539.*

**ECK A., GILLIS J., (1997).** Le fromage: de la science a l'assurance qualité. *Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, pp : 7-39.*

**EMMONS D. B., (1993).** Economic importance of cheese yield. Pages 10–11 in *Factors Affecting the Yield of Cheese. Special Issue 9301. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.*

**FACCIA M., PICARIELLO G., TRANI A., LOIZZO P., GAMBACORTA G., LAMACCHIA C., Di LUCCIA A., (2012).** Proteolysis of Caciocotta cheese made from goat milk coagulated with capriferin (*Ficus carica* sylvestris) or calf rennet. *Eur Food Res Technol* 234:527–533.

**FADYLOGLU S., (2001).** Immobilization and characterization of ficin. *Nahrung/Food* 45 No. 2, pp. 143– 146.

**FALLICO V., McSWEENEY P.L.H., HORNE J., PEDILIGGIERI C., HANNON J.A., CARPINO S. and LICITRA G., (2005).** Evaluation of bitterness in RAGOSANO cheese, *J.Dairy Sci.* 88: 1288-1300.

**FALLICO V., McSWEENEY P.L.H., SIEBERT K.J., HORNE J., CARPINO S. and LICITRA G., (2004).** Chemometric analysis of proteolysis during ripening of Ragosano cheese. *J. Dairy Sci.* 87/ 3138-3152.

**FAO (1988).** LAMBERT, J., C. La transformation laitière au niveau villageois. Etude FAO production et santé animales. 69p.

**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-SIOTA L. et VILLA T. G., (2011).** Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food Bioprocess Technol* 4: 1066–1088.

**FELIX D. et STRIGLER F., (1998).** Evaluation sensorielle : manuel méthodologique. Lavoisier, Paris.

**FERNANDEZ-SALGUERO J., et SANJUAN E., (1999).** Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes milk cheese. *Food Chemistry*, 64, 177-183.

**FERNANDEZ-SALGUERO J., SANJUAN E., et MONTERO E., (1991).** A preliminary study of the chemical composition of Gu!ia cheese. *Journal of Food Composition and Analysis*, 4, 262–269.

**FILION M-M., (2006).** Amélioration de la stabilité thermique du lait par modulation du potentiel d'oxydoréduction. Mémoire pour obtention de grade de maîtrise science (M, Sc.). Université de laval. Québec., pp. 16.

**FINDLAY C.I., STANLEY D.W. et EMMONS D.B., (1984).** Chicken pepsin as a rennet substitute. *Can. Inst. Food Sci. Techno. J.* 17: 097-101.

**FOREST S., KIM S., et LLOYD L., (2003).** *Ficus carica*. Edible fig, Moraceae. United States Geological Survey--Biological Resources Division. Haleakala Field Station, Maui, Hawai'i. 6P.

**FOX P.F, O'CONNOR T.P., McSWEENEY P.L.H., GUINEE T.P. & O'BRIEN N.M., (1996).** Cheese: physical, chemical, biochemical and nutritional aspects. *Advances in Food and Nutritional Research*, 39, 163–328.

**FOX P.F. (2003).** Milk proteins: general and historical aspects. In: *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, vol. 1, pp. 1–48.

**FOX PATRICK F., GUINEE TIMOTHY P., TIMOTHY M., COGAN et MCSWEENEY PAUL L. H., (2000).** Fundamentals of Cheese Science. AN ASPEN PUBLICATION Inc. Gaithersburg, Maryland. P 559.

**FOX, P.F & McSWEENEY, P.L.H., (1997).** Rennets : their role in milk coagulation and cheese ripening. *The Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2nd edn (ed. B.A. Law). Chapman & Hall, London pp. 1–49.

**FREDOT E., (2005).** Connaissance des aliments bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. *Ed. Tec & Doc Lavoisier*. 424p.

**FROC J., (2001).** Des jus de fruits ou de plantes pour faire du fromage. *INRA mensuel n°110*, 41-42.

**GALLARDO-ESCAMILLA F.J., KELLY A.L. et DELAHUNTY C.M., (2005).** Sensory Characteristics and Related Volatile Flavor Compound Profiles of Different Types of Whey *J.Dairy Sci.* 88:2689–2699.

**GERMONVILLE A., (2012).** Agents coagulants. *Ed. Technique de l'ingénieur*. Paris, 12p.

**GLICK D. M., SHALITIN, Y. & HILT C. R., (1989).** Studies on the irreversible step of pepsinogen activation, *Biochemistry* 28, 2626–2630.

**GORDIN S. et ROSENTHAL I. (1978).** Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *Journal of food protection* September Vol. 41 N° 9. 684-688.

**GOROSTIZA A., CICHOSCKI A.J., VALDUGA A.T., VALDUGA E., BERNARDO A. and FRESNO J.M., (2004).** Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free

aminoacids during ripening of artisanal prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. *Food Chemistry*. 85 : 407-414.

**GOUSSEN H., LEROY JF. et OZENDA P., (1982).** Précis de botanique, tome II : végétaux supérieures. Masson : pp 558-560.

**GREEN M. L., (1972).** Assessment of swine , bovine and chicken pepsins as substitutes for Cheddar cheese making. . *J. Dairy Res.*, 39, pp: 421-427.

**GREEN M.L., et STACKPOOLE A., (1975).** The preparation and assessment of a suitable MucorpusillusLindt proteinase – swine Pepsin mixture for cheddar cheese – making. *Journal of dairy research*. 297 – 312.

**GREEN M.L., VALLER M.J. et KAY J. (1984).** Assesment of the suitability for cheddar cheese making of purified and commercial chicken pepsin preparations. *Journal of dairy research* (1984), 51, 331-340.

**GREEN MARGARET L. et LLEWELLIN JOANNA M., (1973).** The Purification and Properties of a Single Chicken Pepsinogen Fraction and the Pepsin Derived from it *Biochem. J.* 133. 105-115.

**GROSCLAUDE F., (1988).** Le polymorphisme genetique des principales lactoproteines bovines. Relation avec la quantite, la composition et les aptitudes fromageres du lait. *INRA Prod. Anim.* 1. 5-17.

**GRZONKA ZBIGNIEW, KASPRZYKOWSKI FRANCISZEK and WICZK WIESLAW., (2007).** Cysteine proteases. CHAPTER 11. *J. Polaina and A.P. MacCabe (eds.), Industrial Enzymes*, 181–195.

**GUARRERA P. M., (2005).** Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium),” *Fitoterapia*, 76:, pp. 1–2.

**HORNE D.S. et BANKS J.M., (2004).** Rennet-induced coagulation of milk. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd edn (eds P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan & T.P. Guinee), vol. 1,pp. 19–45. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

**HUPPERTZ T., UPADHYAY V.K., KELLY A.L. et TAMIME A.Y., (2006).** Constituents and Properties of Milk from Different Species. *Brined Cheeses*. Edited by Dr Adnan Tamime. Copyright © 2006 by Blackwell Publishing Ltd. Pp 1-34.

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

**J.O.R.A.N° 69., (2003).** Arrêté interministériel du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation. Textes Législatifs. Lait et produits laitiers.

**JEANTET R., CROGUENNEC T., MAHAUT M., SCHUCK P., BRULE G., (2008).** Les produits laitiers. Ed.Tec& Doc, Lavoisier, 185 p.

**JONES B.L., (2005).** Endoproteases of barley and malt. *J. Cereal Sci.* 42: 139–156.

**KAGEYAMA T., et TAKAHASHI K., (1976)** Pepsinogène and pepsin from gastric mucosa of japenese monkey.*J.Biochem.*, 79:455-468.

**KATSAROS G.I., KATAPODIS P., TAOUKIS P.S., (2009).** High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain. *Journal of Food Engineering* 91: 42–48

**KIM, J. S., KIM, Y. O.; RYU, H. J., KWAK, Y. S., LEE, J. Y., KANG, H., (2003).** Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. *Plant Cell Physiol.*, 44: 412–419.

**KUCHROO C. N. and FOX P. F., (1982).** Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft.*37: 331–335

**KUMAR S., SHARMA N. S., SAHARAB M. R. et SINGB R., (2005).** Extracellular acid protéase from *Rhizopusoryzae* : purification and characterization. *Elsevier Process Biochemisry.* 40: 1701-1705.

**LABORDA M.A. et RUBIOLO A.C., (1999).** Proteolysis of fynbo cheese salted with NaCl/KCl and ripened at two temperatures. *Journal Of Food Science.* 64: 33-36.

**LAEMMLI U. K. et FVRE M., (1973).** Maturation of the head of the bacteriophage T4. 1. DNA packaging events. *Journal of Molicular Biology.* 80: 575-599.

**LAEMMLI U.K., (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

**LAITIER C., CHATELIN Y.M., DOUTARI E., BARRUCAND P., DUCHESNE C., MORGE S., BARRAL J., CUVILLIER D., MINARD L. et 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. P., PAAVILAINEN, H. M., PAWLUS, A. D., NEWMAN, R. A., (2008).** Ficus spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *J. Ethnopharmacol.*, 119 : 195–213.

**LARBIER M., et LECLERCQ B., (1992).** Nutrition et alimentation des volailles. INRA, Paris, 347 p.

**LAWRENCE, R.C., L.K. CREAMER, et J. GILLES, (1987).** Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 70: 1748–1760.

**LEFEBVRE-CASES E., GASTALDI E., VIDAL V., MARCHESSEAU S., LAGAUDE A., CUQ J.L. et TARODO DE LA FUENTE B., (1998).** Identification of interactions among caseingels using dissociating chemical agents. *J. Dairy Sci.*, 81: 932-938

**LEMIEUX L., SIMARD R.E., (1991).** Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Le Lait*. 71 : 599-636.

**LIBOUGA D.G., (2008).** Étude comparative des coagulations du lait par actions de l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* et des enzymes coagulants bien connus, *TROPICULTURA*. 26 : 43-47.

**LIBOUGA D.G., VERCAIGNE-MARKO D., DJANGAL S. L., I. CHOUKAMBOU, EBANGI A.L., M. OMBIONYO, BEKA R.G., ABOUBAKAR T.M. et GUILLOCHON D., (2006).** Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*. *Tropicultura*, 24, pp : 229-238.

**LO PIERO A.R., PUGLISI I. et PETRONE G., (2002).** Characterization of lettuce, a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2439- 2443.

**LOW Y.H., AGBOOLA S., ZHAO J. & LIM M.Y., (2006).** Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *International Dairy Journal*. 16 : 335-343

- LOWE G., (1976).** The cysteine proteinases. *Tetrahedron*.vol. 32: 291 - 302
- LOWRY O. M., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R.J., (1951).** Protéine measurement with the folin phénol reagent, *J. Dairy sci.*, 193: 265-275
- LUCEY J.A., (2002).** Rennet coagulation of milk *in* ROGINSKI H., FUQUAY J. FOX P. *Encyclopedia of Dairy Science*. Elsevier :286-293.
- LUCEY J.A., JOHNSON M.E., HORNE D.S., (2003).** Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *J. Dairy Sci.*, 86: 2725-2743.
- LUCEY J.L. FOX P.F., (1993).** Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: review. *J. Dairy Sci.* 76: 1714-1724.
- LUQUET et BONJEAN-LINCZOWSKI Y., (1986).** Valeur nutritionnelle du lait et des produits laitiers : Quantités \_énergie et table de composition Ed Tec et Doc Lavoisier Paris : 93-121.
- LUQUET F.M., (1985).** Lait et produits laitiers. Vache, brebis, chevre. 1.Les laits. De la mamelle a la laiterie. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 884p.
- LYNN K. R. et CLEVETTE-RADFORD N. A., (1986).** ficin e, a serine-centred protease from *FicusElastica\**; *J'hyfocht&rry.* 25: 1559-1561.
- MACEDO A., MALCATA F.X., OLIVEIRA J.C., (1993).** The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, 76 : 1725-1739.
- MAHAUT M., JEANTET R., BRULE G., (2003).** Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc Lavoisier. 194p.
- MAHAUT M., JEANTET R., SCHUCK P.et BRULE G., (2000).** Les produits industriels laitiers Ed Tec et Doc. – Lavoisier : pp. 26-40.
- MAHON M. C. et BROWN R. T., (1985).** Chylosine, présure, protéase microbiennes et pepsine. Effert u type d'enzyme sur la coagulation du lait. *J. Dairy sci.*, 68 : 628-632.
- MAMORU SUGIURA and MASANOR SASAKI., (1974).** Studies on proteinases from *ficuscaricavar.* H (~raishi v. purification and properties of a sugar-containing proteinase (flcin s). *Biochimica et Biophysica Acta.*, 350: 38-47

- MARTINS A.P.L., VASCONCELOS M.M.P., SOUSA R.B., (1996).** Thistle (*Cynara cardunculus* L.) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. *Le Lait*, 76: 473–477.
- MAWA S., HUSAIN K., et JANTAN I., (2013).** *Ficus carica* L. (Moraceae): Phytochemistry, Traditional Uses and Biological Activities. Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume 2013, Article ID 974256, 8 pages
- Mc SWEENEY P L H et SOUSA M. J., (2000).** Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. *Le Lait*. 80: 293–324.
- MEHMET Ak S. G. M., (2003).** Cheese Rheology and Texture. CRC Press LLC. 435p.
- MEYER H.K., (2001).** Bitterness in processed cheese caused by an over dose of a specific emulsifying agent; *International dairy journal*. 11: 533-542.
- MICHALSKI M., GASSI J., FAMELART M., LECONTE N., CAMIER B., MICHEL E. et BRIARD V., (2003).** The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese. *Le Lait*. 83 : 131-143.
- MIEYER H.K., ROCKENBAUER C. et MLEAK H., (1998).** Electrophoretic ripening index for the evaluation of proteolysis. *Lait*. 78: 425-438.
- MIGLIOR F., MUIR B. L., et VAN DOORMAAL B. J., (2005).** Selection indices in Holstein cattle of various countries. *J. DairySci*. 88:1255–1263.
- MOLLIMARD P., LEQUERE J.L. et SPINLER H.E., (1997).** Les lipides et la flaveur des produits laitiers. *Journal of Dairy Science*, 4, 301-311.
- Na n° 2787 1993.** Normes Algérienne 1993 sur la densité du lait.
- NASSAR A. H. et NEWBURY H. J., (1987).** Ficin Production by Callus Cultures of *Ficus carica*. *J. PlantPhysiol*. 131: 171-179.
- NICOTRA G., VICENTINI S. et MAZZOLARI A., (2010).** *Ficus carica*. Research and development of a dry extract. *Nutra Foods*. 9: 27-30.



**NOBLE J.E., et BAILEY M.J.A., (2009).** Quantitation of protein. *Methods in enzymology*, 463: 73-94.

**NOEL Y. et LEFIER D., (1991).** Factors affecting the consistency of ripened soft and semi-soft cheese, in *Rheological and Fracture Properties of Cheese*, Brussels: *International Dairy Federation*. IDF Bulletin. 268: 44–48.

**NOUANI A., DAKO E., MORSLI A., BELHAMICHE N., BELBRAOUE S., BELLAL M.M. et DADIE A., (2009).** Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J. Food Technol.*, 7: 20-29.

**NOUANI A., HAMRANI L., BELLAL M. M., (2011).** Purification et caractérisation de protéase coagulant le lait extraite a partir du proventricule de poulet (*gallus gallus*). Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 29 et 30 mars 2011.

**O'REILLY C. E., KELLY L. A., OLIVEIRA C. J., MURPHY M. P., AUTY A.E. M. et BERESFORD T. P., (2003).** Effect of varying high-pressure treatment conditions on acceleration of ripening of cheddar cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 4: 277–284

**O'SULLIVAN N.A., SOUSA M.J., D. O'GRADY-WALSH, T. UNIACKE, A.L. KELLY et McSWEENEY P.L.H., (2005).** Ripening of Camembert-type cheese made from caprine milk using calf rennet or kid rennet as coagulant. *International Journal of Dairy Technology*. 58: 13-18.

**OLIVEIRA ANDREIA P., SILVA LUI'S R., FERRERES FEDERICO, PINHO PAULAGUEDES DE, VALENTA PATRICIA O., BRANCA M. SILVA, JOSE' A. PEREIRA, and ANDRADE PAULA B., (2010).** Chemical Assessment and in Vitro Antioxidant Capacity of Ficus carica Latex. *J. Agric. Food Chem.* 58: 3393–3398.

**ONER M. D. et AKAR B., (1993).** Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilization in Gaziantep cheese production. *Lebensm. -Wiss. U. Technol.*, 26: 318-321

**ONS, (2011).** Office national des statistiques (site officiel).

**PAEZ DE LEON L, PINZON G, OTAIZA VASQUEZ E. ACTA CIENT VENE Z., (1995).** Purification and assay of chicken pepsin; PubMed - indexed for MEDLINE. 46: 237-41.

- PAQUET D., (1977).** Etude d'une protéase acide, produite par *Mucor meihei*. Doctorat, bioch., univ. Nancy 1, France, 52-82
- PAVIA M., TRUJILLO A. J., GUAMIS B. and FERRAGUT V., (2000).** Proteolysis in Manchego-Type Cheese Salted by Brine Vacuum Impregnation. *J. of Dairy Sci.*, 83: 1441–1447.
- PAYNE T. C., (2009).** Enzymes in Meat Systems Enzymes. Chapter 8. R. Tarté (ed.), *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*. 26p.
- PELLISSIER J.P., (1984).** Protéolyse des caséines. *Sciences des Aliments*. 4 : 1-35.
- RAMEAU J. C., MANSION D., DUME G, et GAUBERVILLE C., (2008).** Flore forestière de France : Région méditerranéenne. Ed. France. Institut pour le développement forestier. 631p.
- RAMET J.P., (1985).** Study of enzymatic coagulation of camel milk in Saudia-Arabia. Mission Report. FAO.
- RAMET J.P., (1997).** Les agents de transformation du lait *in* Le fromage, 3eme édition, Tech. & Doc. Paris, pp: 165-172.
- RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S., DESHPANDE V.V., (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62; 597–635.
- RAO M.TANKSAL A.M. GHATGE M. S. and DESHPAND V.V., (1999).** Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiology and molecular Biology Reviewx*. 62. 597-635.
- RIBADEAU-DUMAS B., (1991).** Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimiques des protéines laitières. *Le lait*, 400: 17-32.
- RIFFAAT I.D., EI-SHIBINI S., ABD-SALAM M., & FAHIM A.H., (1970).** Studies on milk clotting enzymes from higher plants. *J.Dairy Sci.*, 23 : 151-154.
- ROBBINS B.H., (1930).** A proteolytic enzyme in ficin, the anthelmintic principle of leche de higueron. *J. Biol. Chem.* 87: 251\_257.

- RODNEY BROWN J. et EMSTROM C. A., (1988).** Milk-Clotting Enzymes and Cheese Chemistry Part I-Milk-Clotting Enzymes. N. P. Wong et al. (eds.), *Fundamentals of Dairy Chemistry*. 609-654.
- ROSEIRO L.B., BARBOSA M., M AMES J. et WILBEY R.A., (2003).** Cheesemaking with vegetable coagulants the use of *CynaraL.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*. 56: 76-85.
- SANDHYA C., SUMANTHA A., SZAKACS G. et PANDEY A., (2005b).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, 40; 2689–2694.
- SANJUÁN E., MILLÁN R, SAAVEDRA P., CARMONA MA, GOMEZ R., FERNÁNDEZ-SALGUERO J., (2002).** Influence of animal and vegetable rennet on the physiochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chem.* 78:281–289.
- SCHMIDT D.G., (1982).** Association of caseins and casein micelle structure. *In: Developments of dairy chemistry 1-proteins. Applied science publishers.* 61-86.
- SCOTT R., (1981).** Cheese making practice, Applied Science Publishers, London, 4-165.
- SCRIBAN R., (1988).** Biotechnologie ; Troisième édition. *Tech et doc.* 266-486.
- SHAH MANZOOR. A , SHABIR A. M. et ARAY M. A. P., (2014).** Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Sci. & Technol.* 94: 5–16.
- SILVA S. V. et MALCATA F. X., (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. *J. Dairy Sci.* 88:1947–1954.
- SINGLETON A. et BUTTLE D. J., (2013).** Ficin. *Handbook of Proteolytic Enzymes.* 2: 1141-1143.
- SOLOMON A., GOLUBOWICZ S., YABLOWICZ Z., (2006).** Antioxidant. activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus caricaL.*),” *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54: 7717–7723.

**SOUSA M. J. and McSWEENEY P. L. H., (2001).** Studies on the ripening of Cooleeney, an Irish farmhouse Camembert type cheese. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 40: 83–95.

**SOUSA M.J., Ard.o Y. et McSWEENEY P.L.H., (2001).** Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*. 11: 327–345.

**STANLEY D. W., EMMONS D.B., MODLER H.W. et MIRVINE D., (1980).** Cheddar Cheese Made With Chicken Pepsin. *Can. Inst. Food Sci. Technol. 1*. 13: 97-102.

**TSOULI J., (1979).** Etude d'une protease coagulante extraite de *Cynarascolumus* et de *Cynaracardunculus*, adaptation de la méthode conductimétrique pour la détermination du temps de coagulation du lait et le contrôle des fabrications. Doctorates-sci., Univ. C. Bernard, Lyon, 1-62.

**TSUDA T., YAMADA M., NAKAGAWA S., TSUKASAKI F. et NAKAZAWA Y., (1994).** Capillary isotachophoretic measurements of lower molecular weight peptides and biochemical changes during ripening of Camembert cheese. *Milchwissenschaft*. 49 : 200–204.

**VALLES et FURET, (1977).** Etudes des caillettes des bovins à l'état ruminants pour l'obtention d'extrait coagulants à base de pepsine bovine ; méthode d'extraction. *Lait*, 61 : 601-617.

**VANDEWEGH J., (1997).** Le rendement en fromage: prédétermination et mesure, *in* : ECK A. Le fromage. 2ème édition Tec et Doc Lavoisier, pp : 791 – 874.

**VEBERIC R., JAKOPIC J., et STAMPAR F., (2008).** Internal fruit quality of figs (*Ficus carica*L.) in the Northern Mediterranean Region. *Italian Journal of Food Science*, 20: 255–262.

**VEISSEYRE R., (1975).** Technologie du lait. Constitution, récolte, traitement et transformation du lait. 3ème édition. La Maison Rustique, Paris, France, 713 p.

**VEISSEYRE R., (1979).** La technologie du lait, constitution, récolte, traitement et transformation du lait. Edition. Maison rustique. 697p.

**VELOSO Ana C.A., NATERCIA T. et FERREIRA I. M. P. L. V. O., (2002).** Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid

chromatography and urea–polyacrylamide gel electrophoresis Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*. 967: 209–218.

**VERDINI R.A., ZORRILLA S.E., RUBIOLO A.C., (2003).** Characterisation of soft cheese proteolysis by RP-HPLC analysis of its nitrogenous fractions. Effect of ripening time and sampling zone. *International Dairy Journal*.ARTICLE IN PRESS.

**VIDAUD J., (1997).** le figuier monographie de CTIFL (centre technique interprofessionnel des fruits et légumes). 267p.

**VIERLING, (2003).** Aliments et boissons. Filière et produits. *Doin éditeurs*. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.

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

**VILMORIN J-B., (2003).** Histoire d'arbre. Ed. Jean Paul Gisserot. 74p.

**WALSTA P., (1990).** On the stability of casein micelles, *J Dairy Sci*. 73: 1965-1979.

**WALSTRA P., (1999).** Casein submicelles: do they exist. *International Dairy Journal* 9 : 189-192.

**WALSTRA P., BLOOMFIELD V.A., WEI G.J. and JENNESS R., (1981).** Effect of chymosine on the hydrodynamic diameter of casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 669: 258-259.

**WALSTRA PIETER, WOUTERS JAN T.M. et GEURTS TOM J., (2006).** Dairy Science and Technology. Second Edition. ED Taylor & Francis Group, LLC. 756p.

**WANGOH, J., FARAH, Z. et PUHAN, Z. (1993).** Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract. *Milchwissenschaft Vom*.48: 322-325.

**WATTS B.M., YLIMAKI G.L., JEFFERY L.E. et ELIAS L.G., (1991).** Méthodes de base pour l'évaluation sensorielle des aliments. Ed. Centre de recherches pour le développement international, Amérique, 145 p.

**WAUGH D.F., CREAMER L.K., SLATTERY C.W. et DRESDNER G.W., (1970).** Core polymers of casein micelles. *Biochemistry*, 9: 786-795.

**WHITEHURST R. J. et VAN O. M., (2010).** Enzymes in Food Technology. 2<sup>ème</sup> édition. Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1-405-18366-6.

**WIGLEY, R. C., (1996).** Cheese and whey in *industial enzymologie. Seconde Ed. Chap. 27. Ed. Godfrey and Wiest. 135-142.*

**WILLIAMS DONALD C., SGARBIERI VALDEMIRO C., et WHITAKER JOHN R., (1968).** Proteolytic Activity in the Genus Ficus. *Plant Physiol.* 43: 1083-1088.

**WRIGHT A.J., SCANLON M.G., HARTEL R.W., and MARANGONI A.G., (2001).** Rheological Properties of Milkfat and Butter *journal of food science.* 66:1056-1071.

**WU T.Y., MOHAMMAD A.W., JAHIM J.MD. et ANUAR N., (2006).** Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillusterreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microb. Technol.*, 39: 1223–1229.

**ZARE H., MOOSAVI-MOVAHEDI A. A., SALAMI M., MORTEZA M., SABOURY A. A. et SHEIBANI N., (2013).** Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. *Phytochemistry* 87: 16–22.

**ZIKIOU A., (2013).** La coagulation du lait par l'extrait des fleurs de cardon (*Cynaracardunculus*). Mémoire magister, université Mentouriconstantine, 119p.

# *Annexes*

**Annexe 01 : extraction des enzymes**

**Extraction de la pepsine de poulet**



Proventricule



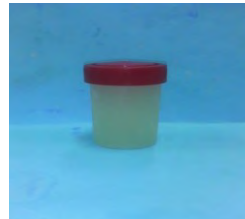
Broyage



Macération



Extrait de pepsine brut



Extrait de pepsine clarifié



**Extraction de la ficine**



Récupération de latex



Latex



Extrait brut de ficine



Annexe 02 : étapes de la fabrication de Camembert



Salle de production de Camembert et bassin de lait avant coagulation



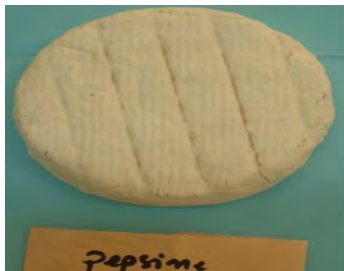
Tranchage des coagulums obtenu avec 1 : la ficine. 2 : la pepsine



Moulage      Egouttage



Salage      Egouttage



Les fromages obtenus après affinage

**Annexe 03** : Fiches de dégustation, résultats ANOVA et tableau statistique.

A. Fiches de dégustation

**FICHE DU TEST DE CLASSEMENT PAR RANG**

NOM : .....

PRENOM : .....

DATE : .....

Analysez et gouttez les trois échantillons, puis classez les par ordre croissant selon votre préférence (attribuez 1 à l'échantillon que vous préférez puis 2 et ensuite 3 pour le moins apprécié).

Codes

Classement

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## FICHE DU TEST D'INTENSITE

NOM : .....

PRENOM : .....

DATE : .....

Examinez et gouttez chaque un des trois échantillons, puis donnez une note de 1 à 9 selon l'intensité de chaque caractère.

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

	A	B	C
Couleur jaune			
Rugosité			
Texture lisse			
Texture moelleuse			
Odeur lactique			
Odeur de levure			
Odeur animale			
Odeur de l'herbe			
Odeur de rance			
Gout salé			
Gout amer			
Gout acide			
Gout d'astringence			
Dispersion dans la bouche			
Solubilité dans la bouche			
Aspect crémeux			

## B. Tableau statistique

**Différences des sommes de classes  $H(1)$  par rang absolu critiques  $p=0,05$  les comparaisons de «tous les traitements» à un seuil de signification de 5 %**

Dégustateurs (i)	Nombre d'échantillons									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
3	8	9	11	13	15	18	20	23	25	28
4	7	10	13	15	18	21	24	27	30	33
5	8	11	14	17	20	24	27	30	34	37
6	9	12	15	19	22	26	30	34	37	42
7	10	13	17	20	24	28	32	36	40	44
8	10	14	18	22	26	30	34	38	42	47
9	10	15	19	23	27	32	36	41	45	50
10	11	15	20	24	28	34	38	43	48	53
11	11	16	21	25	30	35	40	45	51	56
12	12	17	22	27	32	37	42	48	53	58
13	12	18	23	28	33	39	44	50	55	61
14	13	18	24	29	34	40	46	52	57	63
15	13	19	24	30	36	42	47	53	59	65
16	14	19	25	31	37	43	49	55	61	67
17	14	20	26	32	38	44	50	56	63	69
18	15	20	26	32	38	45	51	58	65	71
19	15	21	27	33	39	46	53	60	68	73
20	16	21	28	34	41	47	54	61	69	75
21	16	22	28	35	42	49	56	63	71	77
22	16	22	28	35	42	50	57	64	71	78
23	16	23	30	37	44	51	58	65	73	80
24	17	23	30	37	45	52	59	67	74	82
25	17	24	31	38	46	53	61	68	76	84
26	17	24	32	39	46	54	62	70	77	85
27	18	25	32	40	47	55	63	71	79	87
28	18	25	32	40	48	56	64	72	80	89
29	18	26	33	41	49	57	65	73	82	90
30	19	26	34	42	50	58	66	75	83	92
31	19	27	34	42	51	59	67	76	85	93
32	19	27	35	43	51	60	68	77	86	95
33	20	27	35	44	52	61	70	78	87	96
34	20	28	36	44	53	62	71	79	88	98
35	20	28	37	45	54	63	72	81	90	99
36	20	29	37	46	55	63	73	82	91	100
37	21	29	38	46	56	64	74	83	92	101
38	21	30	38	47	56	65	75	84	94	102
39	21	30	39	48	57	66	76	85	95	103
40	21	30	39	48	57	67	76	86	96	104
41	22	31	40	49	58	68	77	87	97	107
42	22	31	40	49	59	69	78	88	98	108
43	22	31	41	50	60	69	79	89	99	110
44	22	32	41	51	60	70	80	90	101	111
45	23	32	41	51	61	71	81	91	102	112
46	23	32	42	52	62	72	82	92	103	114
47	23	32	42	52	63	73	83	93	104	115
48	23	33	43	53	63	73	84	94	105	116
49	24	33	43	53	64	74	85	95	106	117
50	24	34	44	54	64	75	86	96	107	118
51	25	35	45	55	65	76	87	98	108	120
52	26	37	48	58	70	82	94	106	117	128
53	27	38	50	61	73	85	97	110	122	135
54	28	40	52	64	76	88	101	114	127	140
55	29	41	53	65	78	91	105	118	131	145
56	30	42	55	68	81	94	108	122	136	150
57	31	44	57	70	84	97	111	125	140	154
58	32	45	58	72	86	100	114	128	144	159
59	33	46	60	74	88	103	118	133	148	163
60	34	47	61	75	89	105	121	136	151	167

Ces ce sont des valeurs exactes adaptées de Hollander et Wolfe (1973) jusqu'à 15 dégustateurs.

On peut se servir d'interpolation pour les valeurs de tableaux non spécifiés. Il faut appeler à plus de 30 dégustateurs.

## C. Résultats d'analyse ANOVA

**Tableau I :** Les notes des attributs sensoriels données aux différents fromages au 1<sup>er</sup> jour

<b>Attributs</b>	<b>F. Ficine</b>	<b>F. Pepsine</b>	<b>F. témoin</b>
Couleur jaune	4,20 <sup>a</sup>	5,00 <sup>a</sup>	4,30 <sup>a</sup>
Rugosité	4,90 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>	5,60 <sup>a</sup>
Texture lisse	4,80 <sup>a</sup>	5,60 <sup>a</sup>	4,40 <sup>a</sup>
Texture moelleuse	3,50 <sup>a</sup>	4,60 <sup>a</sup>	3,80 <sup>a</sup>
Odeur lactique	4,50 <sup>a</sup>	5,30 <sup>a</sup>	5,00 <sup>a</sup>
Odeur de levure	2,40 <sup>a</sup>	3,70 <sup>a</sup>	2,50 <sup>a</sup>
Odeur animale	0,60 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>
Odeur de l'herbe	0,80 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>	0,30 <sup>a</sup>
Odeur de rance	0,80 <sup>a</sup>	1,90 <sup>a</sup>	1,20 <sup>a</sup>
Gout salé	4,80 <sup>a</sup>	4,80 <sup>a</sup>	2,70 <sup>b</sup>
Gout amer	3,30 <sup>b</sup>	6,00 <sup>a</sup>	2,80 <sup>b</sup>
Gout acide	2,40 <sup>b</sup>	5,00 <sup>a</sup>	2,40 <sup>b</sup>
Gout d'astringence	2,90 <sup>a</sup>	2,90 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>
Dispersion dans la bouche	4,60 <sup>a</sup>	4,90 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>
Solubilité dans la bouche	4,20 <sup>a</sup>	5,50 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>
Aspect crémeux	3,20 <sup>a</sup>	4,30 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>

**Tableau II:** Les notes des attributs sensoriels données aux différents fromages au 6<sup>ème</sup> jour

<b>Attributs</b>	<b>F. Ficine</b>	<b>F. Pepsine</b>	<b>F. témoin</b>
Couleur jaune	3,70 <sup>a</sup>	5,30 <sup>a</sup>	5,10 <sup>a</sup>
Rugosité	3,40 <sup>a</sup>	4,90 <sup>a</sup>	3,20 <sup>a</sup>
Texture lisse	6,50 <sup>a</sup>	3,90 <sup>b</sup>	6,30 <sup>a</sup>
Texture moelleuse	3,40 <sup>b</sup>	7,00 <sup>a</sup>	3,90 <sup>b</sup>
Odeur lactique	4,60 <sup>a</sup>	6,10 <sup>a</sup>	5,40 <sup>a</sup>
Odeur de levure	2,30 <sup>a</sup>	3,20 <sup>a</sup>	2,40 <sup>a</sup>
Odeur animale	1,70 <sup>a</sup>	0,90 <sup>a</sup>	1,70 <sup>a</sup>
Odeur de l'herbe	1,00 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>
Odeur de rance	1,30 <sup>a</sup>	2,50 <sup>a</sup>	1,70 <sup>a</sup>
Gout salé	3,10 <sup>a</sup>	3,40 <sup>a</sup>	2,60 <sup>a</sup>
Gout amer	3,00 <sup>b</sup>	7,40 <sup>a</sup>	1,80 <sup>b</sup>
Gout acide	2,60 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>	2,10 <sup>a</sup>
Gout d'astringence	2,70 <sup>a</sup>	4,60 <sup>a</sup>	2,60 <sup>a</sup>
Dispersion dans la bouche	4,10 <sup>a</sup>	5,90 <sup>a</sup>	4,10 <sup>a</sup>
Solubilité dans la bouche	4,70 <sup>a</sup>	6,00 <sup>a</sup>	4,70 <sup>a</sup>
Aspect crémeux	3,10 <sup>a</sup>	4,70 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>

**Tableau III** : Les notes des attributs sensoriels données aux différents fromages au 13<sup>ème</sup> jour

<b>Attributs</b>	<b>F. Ficine</b>	<b>F. Pepsine</b>	<b>F. témoin</b>
Couleur	6,10 <sup>a</sup>	4,60 <sup>a</sup>	5,50 <sup>a</sup>
Rugosité	4,40 <sup>a</sup>	3,60 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>
Texture lisse	5,60 <sup>a</sup>	2,80 <sup>b</sup>	5,10 <sup>a</sup>
Texture moelleuse	4,50 <sup>a,b</sup>	6,00 <sup>a</sup>	4,00 <sup>b</sup>
Odeur lactique	3,90 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>	3,30 <sup>a</sup>
Odeur de levure	2,40 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>	1,70 <sup>a</sup>
Odeur animale	1,70 <sup>a</sup>	2,40 <sup>a</sup>	1,40 <sup>a</sup>
Odeur de l'herbe	0,80 <sup>a</sup>	1,40 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>
Odeur de rance	2,20 <sup>a</sup>	2,90 <sup>a</sup>	2,20 <sup>a</sup>
Gout salé	4,40 <sup>a</sup>	5,20 <sup>a</sup>	4,20 <sup>a</sup>
Gout amer	5,90 <sup>a,b</sup>	7,50 <sup>a</sup>	3,90 <sup>b</sup>
Gout acide	4,10 <sup>a</sup>	5,00 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>
Gout d'astringence	4,50 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>	2,90 <sup>a</sup>
Dispersion dans la bouche	5,50 <sup>a</sup>	6,00 <sup>a</sup>	5,20 <sup>a</sup>
Solubilité dans la bouche	5,30 <sup>a</sup>	6,40 <sup>a</sup>	5,70 <sup>a</sup>
Aspect crémeux	4,80 <sup>a</sup>	4,80 <sup>a</sup>	4,40 <sup>a</sup>

**Tableau IV** : Les notes des attributs sensoriels données aux différents fromages au 20<sup>ème</sup> jour

<b>Attributs</b>	<b>F. Ficine</b>	<b>F. Pepsine</b>	<b>F. témoin</b>
Couleur jaune	5,90 <sup>a</sup>	6,70 <sup>a</sup>	5,60 <sup>a</sup>
Rugosité	5,30 <sup>a</sup>	3,70 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>
Texture lisse	5,80 <sup>a</sup>	3,30 <sup>b</sup>	5,90 <sup>a</sup>
Texture moelleuse	5,33 <sup>a</sup>	5,90 <sup>a</sup>	3,20 <sup>b</sup>
Odeur lactique	3,70 <sup>a</sup>	5,60 <sup>a</sup>	4,20 <sup>a</sup>
Odeur de levure	1,60 <sup>a</sup>	2,10 <sup>a</sup>	1,30 <sup>a</sup>
Odeur animale	0,90 <sup>a</sup>	2,80 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>
Odeur de l'herbe	0,10 <sup>a</sup>	0,30 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>
Odeur de rance	0,90 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>	1,20 <sup>a</sup>
Gout salé	4,60 <sup>a</sup>	4,40 <sup>a</sup>	3,80 <sup>a</sup>
Gout amer	6,40 <sup>a</sup>	7,00 <sup>a</sup>	2,10 <sup>b</sup>
Gout acide	2,20 <sup>a</sup>	2,90 <sup>a</sup>	2,20 <sup>a</sup>
Gout d'astringence	3,40 <sup>a</sup>	3,20 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>
Dispersion dans la bouche	4,80 <sup>a</sup>	5,20 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>
Solubilité dans la bouche	4,90 <sup>a</sup>	5,70 <sup>a</sup>	5,10 <sup>a</sup>
Aspect crémeux	3,40 <sup>a</sup>	5,60 <sup>a</sup>	4,10 <sup>a</sup>

**Tableau V** : Les notes des attributs sensoriels données aux différents fromages au 28<sup>ème</sup> jour

<b>Attributs</b>	<b>F. Ficine</b>	<b>F. Pepsine</b>	<b>F. témoin</b>
Couleur jaune	5,00 <sup>a</sup>	5,20 <sup>a</sup>	5,10 <sup>a</sup>
Rugosité	4,30 <sup>a</sup>	3,90 <sup>a</sup>	4,90 <sup>a</sup>
Texture lisse	7,80 <sup>a</sup>	4,20 <sup>b</sup>	6,10 <sup>b</sup>
Texture moelleuse	5,70 <sup>a</sup>	6,10 <sup>a</sup>	3,90 <sup>b</sup>
Odeur lactique	3,20 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>	4,10 <sup>a</sup>
Odeur de levure	2,40 <sup>a</sup>	4,20 <sup>a</sup>	3,50 <sup>a</sup>
Odeur animale	1,40 <sup>a</sup>	2,60 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>
Odeur de l'herbe	1,00 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>	0,90 <sup>a</sup>
Odeur de rance	1,40 <sup>a</sup>	2,40 <sup>a</sup>	1,50 <sup>a</sup>
Gout salé	4,20 <sup>a</sup>	4,60 <sup>a</sup>	3,80 <sup>a</sup>
Gout amer	6,70 <sup>a</sup>	6,10 <sup>a</sup>	2,50 <sup>b</sup>
Gout acide	3,70 <sup>a</sup>	3,70 <sup>a</sup>	3,30 <sup>a</sup>
Gout d'astringence	4,20 <sup>a</sup>	3,60 <sup>a</sup>	2,40 <sup>a</sup>
Dispersion dans la bouche	4,50 <sup>a</sup>	5,90 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>
Solubilité dans la bouche	4,00 <sup>b</sup>	7,00 <sup>a</sup>	4,50 <sup>b</sup>
Aspect crémeux	2,30 <sup>b</sup>	4,90 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a, b</sup>

**Tableau VI** : Les notes des attributs sensoriels données aux différents fromages au 37<sup>ème</sup> jour

<b>Attributs</b>	<b>F. Ficine</b>	<b>F. Pepsine</b>	<b>F. témoin</b>
Couleur jaune	6,40 <sup>a</sup>	5,50 <sup>a</sup>	6,10 <sup>a</sup>
Rugosité	4,40 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>	5,00 <sup>a</sup>
Texture lisse	6,40 <sup>a</sup>	3,60 <sup>b</sup>	5,00 <sup>a</sup>
Texture moelleuse	6,20 <sup>a</sup>	7,00 <sup>a</sup>	4,20 <sup>b</sup>
Odeur lactique	4,10 <sup>a</sup>	5,40 <sup>a</sup>	4,90 <sup>a</sup>
Odeur de levure	3,30 <sup>a</sup>	4,60 <sup>a</sup>	4,70 <sup>a</sup>
Odeur animale	2,80 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>
Odeur de l'herbe	1,80 <sup>a</sup>	1,90 <sup>a</sup>	1,70 <sup>a</sup>
Odeur de rance	2,70 <sup>a</sup>	3,50 <sup>a</sup>	2,90 <sup>a</sup>
Gout salé	4,90 <sup>a</sup>	5,50 <sup>a</sup>	4,90 <sup>a</sup>
Gout amer	6,70 <sup>a</sup>	7,50 <sup>a</sup>	4,00 <sup>b</sup>
Gout acide	4,40 <sup>a</sup>	5,30 <sup>a</sup>	3,30 <sup>a</sup>
Gout d'astringence	4,30 <sup>a</sup>	4,90 <sup>a</sup>	3,40 <sup>a</sup>
Dispersion dans la bouche	4,30 <sup>a</sup>	5,30 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>
Solubilité dans la bouche	4,80 <sup>a</sup>	5,20 <sup>a</sup>	5,50 <sup>a</sup>
Aspect crémeux	4,00 <sup>a</sup>	5,00 <sup>a</sup>	3,60 <sup>a</sup>

## Annexe 04 : production scientifique



## Le IIème Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des bio-ressources



### ESSAI DE FABRICATION D'UN FROMAGE A PATE MOLE EN UTILISANT L'EXTRAIT DE PEPSINE COMME AGENT COAGULANT

SIAR E.\*, DERARDJA A. et ZIDOUNE M. N.

Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (I.N.A.T.A.A.)

Université Constantine -1- route Ain El Bey Constantine, Algérie, 25000

\*hocines1@hotmail.fr

#### RÉSUMÉ

L'Algérie importe la totalité des agents coagulants utilisés en industrie fromagère, bien qu'elle a un potentiel de production des succédanés capable de subvenir aux besoins en coagulants, les sous produits de l'industrie avicoles (les proventicules) peuvent constituer une source très importante en pepsine utilisable en industrie fromagère à la place de la présure, l'enzyme est extraite sous forme de pepsinogène, clarifiée et activée.

Afin d'étudier la possibilité de l'utilisation de la pepsine comme agent coagulant à la place de la présure à l'échelle industrielle nous avons réalisé une fabrication d'un fromage à pate mole type camembert, en suivant le diagramme technologique de fabrication adapté par l'unité. Après affinage (13 jours), nous avons réalisés une série d'analyses physico-chimiques et sensorielles. Les résultats obtenus ont révélés des différences entre les fromages obtenus de point de vue texture où le fromages obtenus avec la pepsine ont une texture plus molle que le témoin ainsi que dans le goût où le camembert fabriqué a développé un goût d'amertume élevé comparé à celle de fromage témoin cet amertume est due principalement à l'activité protéolytique élevée de la pepsine, donc la pepsine peut remplacer la présure dans la fabrication des fromages si on arrive à limité son pouvoir protéolytique.

**Mots clés :** agent coagulant ; pepsine ; présure ; fromage.

#### INTRODUCTION

L'accroissement de la production fromagère mondiale a provoquée une pénurie en présure traditionnelle, la totale dépendance que connaît notre pays vis à vis les laboratoires étrangers en matière d'approvisionnement en présure nous a poussés à la recherche de succédanés de la présure de différentes origines, susceptibles de répondre aux besoins de la demande en agents coagulants bon marché. Par ailleurs, les enzymes d'origine animale sont pour la plupart, obtenues à partir de sous produits d'abattage, tel la pepsine de poulet obtenues à partir des proventicules qui est utilisée dans la fabrication d'un fromage traditionnelle algérien. Le but de ce travail est d'étudier la possibilité d'employer l'extrait du pepsine dans l'industrie fromagère comme succédané de la présure afin de donner un autre source en agents coagulants et de réduire le coût d'importation en agents coagulants.

#### MATERIEL ET MÉTHODES

Les proventicules utilisés ont été récupérés au niveau de l'abattoir « En-nour » situé dans la région El-Meria (Constantine).

L'extraction de la pepsine est réalisée en suivant le protocole d'extraction proposé par BOHAK, (1970).

L'essai de fabrication est réalisé dans une laiterie locale en suivant le diagramme de fabrication par l'unité, la quantité de lait utilisé est de 50 litres coagulé avec 45 ml de l'extrait enzymatique.



Figure 01 : un dégustateur réalisant un teste sensoriel.

L'analyse sensorielle a été réalisée au Laboratoire de Transformation et Elaboration des Produits Alimentaires (TEPA) de l'I.N.A.T.A.A.

Les tests effectués sont :

- teste triangulaire;
- teste hédonique .

#### RESULTAS ET DISCUSSION



Figure 02 : photos de fromage obtenu avec l'extrait de la pepsine (13<sup>ème</sup> jour).



Figure 03 : photos de fromage témoin (obtenus avec la présure) (13<sup>ème</sup> jour).

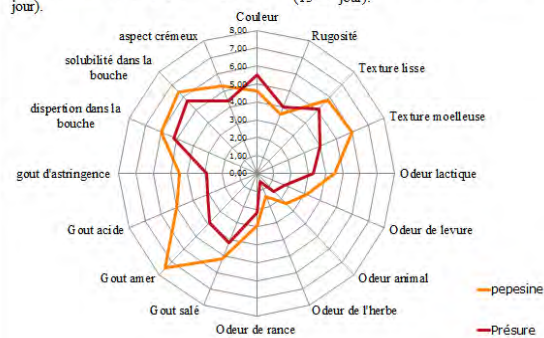


Figure 04 : profil sensoriel de fromage obtenu avec l'extrait de la pepsine de poulet et le fromage témoin (obtenus avec la présure après 13 jours de fabrication).

L'analyse sensoriel a révélée qu'il existe des différences entre le fromage fabriqué avec la pepsine et le fromage obtenu avec la présure de point de vu texture et goût, en effet le fromage obtenu avec la pepsine de poulet a une texture moelleuse ainsi qu'un goût amère plus développé le fromage obtenu avec la présure

#### 4. CONCLUSION

Les résultats obtenus prouve que les sous produit de l'industrie avicole (proventicules) peuvent être une source non négligeable en pepsine utilisable en fromagerie comme succédané de la présure.



3<sup>ème</sup> FORUM National Agro-Vétérinaire : Tiaret du 14 au 16 Mai 2014

**Valorisation d'un sous produit de l'industrie avicole (proventricule de poulet) pour l'extraction d'un agent coagulant (pepsine de poulet) en vue de son utilisation dans l'industrie fromagère**

**SIAR E. H., DERRARDJA A., ZIKIOU A., FETOUHI A., ZIDOUNE M. N.**

Contact : [hocines1@hotmail.fr](mailto:hocines1@hotmail.fr)

Laboratoire de Transformation et Elaboration des Produits Alimentaires (T.E.P.A.) de l'I.N.A.T.A.A

**Résumé**

Les sous-produits de l'industrie avicoles peuvent constituer une source très importante en agents coagulants utilisable en industrie fromagère comme succédané de la présure. La pénurie de présure et le coût très élevé des importations ainsi que la dépendance de notre pays de fournisseurs étranger en matière d'approvisionnement en présure et succédanés nous a poussé à chercher d'autres sources peu couteuse telle la pepsine de poulet extraite à partir des proventricules et les enzymes connues dans nos pratiques traditionnelles. Ces enzymes sont extraites sous forme de pepsinogènes, activés puis clarifiés par centrifugation. La protéase obtenue est caractérisée par son poids moléculaire déterminé par une électrophorèse SDS-PAGE. La teneur en protéine dans l'extrait clarifié, son activité coagulante, sa force de coagulation et son activité protéolytique sont aussi évaluées pour permettre une comparaison à la présure. Le poids moléculaire de l'enzyme obtenue est d'environ 35 KDa, avec une concentration en protéines de 20,10 mg/ml d'extrait, une activité coagulante de 18,61 UP/ml et une force de coagulation de 1/6041, l'extrait de pepsine clarifier de pepsine présente une activité protéolytique 3 fois plus élevée que celle de la présure.

- **Mots clés : proventricules ; agent coagulant ; pepsine ; présure.**

## Summary

The aim of the present work is the characterization of extracted ficin from fig latex (*Ficus carica*) and the extracted pepsin from chicken proventriculus. This characterization mainly targeted the determination of activity and coagulant force. Also, the proteolytic activity and the types of interactions involved in the formation of gels in comparison with animal rennet studied.

On the other hand, a test of the use of ficin and pepsin in the coagulation of the milk as a substitute for rennet in the preparation of a soft cheese type "Camembert" was performed.

The main results obtained have shown that the extract of ficin exhibits coagulant activity of 121,69 UP and a force coagulant 1/42059. For chicken pepsin coagulant activity is 18.61 UP and the force coagulant 1/6041. In addition, the proteolytic activity was estimated at 469.7  $\mu\text{g}$  and 117  $\mu\text{g}$  tyrosine equivalent per ml of enzyme for ficin and pepsin. The study of the interactions involved in the formation of ficin and pepsin gels showed the preponderance of hydrophobic bonds, followed by hydrogen bonds and the calcium bonds.

The soft cheeses type "Camembert" obtained with ficin, or pepsin presented large similarities on the map color, smell and taste compared to control cheese (microbial substitute). Nevertheless, some differences were found including the level of bitterness and texture for both enzymes. We report on the other hand, that cheese yields are 33.25% and 37.82% in the case of ficin and pepsin respectively. These yields are relatively low compared to the control cheese estimated at 38.41%.

These results reflect the ability to override the rennet by ficin and/or chicken pepsin in the cheese manufacturing. However, this study deserves to be extended to other cheeses and pursued for reason to improve yields and cheese quality.

---

**Key words:** Ficin, pepsin of chicken, substitute for rennet, characterization, interactions, soft cheese.

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو توصيف إنزيم الفيسين ( la ficine ) المستخلص من النسغ الكامل لشجرة التين ( *Ficus carica* ) وإنزيم البييسين ( pepsine ) المستخلص من *proventricules* الدجاج . هذا التوصيف يهدف أساسا إلى تحديد نشاط و قوة التخثر . كما تمت دراسة قوة إماهة البروتينات ( *activité protéolytique* ) ومختلف التفاعلات التي تشارك في تشكل خثرة الحليب مقارنة مع الأنفحة الحيوانية (البريزور).

من ناحية أخرى ، تم استخدام الفيسين و البييسين ( *ficine et pepsine* ) كبديل عن البريزور ( *présure* ) في إنتاج جبن طري من نوع " كاممبير " ( *Camembert* ).

النتائج المحصل عليها أظهرت أن مستخلص الفيسين يمتلك نشاط تخثري يقدر بـ 121.69 UP و قوة تخثر 42059/1 . فيما يخص بييسين الدجاج فقد سجلنا نشاط تخثري يقدر بـ U.P. 18.61 و قوة تخثر 6041/1 بالإضافة إلى ذلك، قدرت قوة إماهة البروتينات بـ 469.7  $\mu\text{g}$  و 117  $\mu\text{g}$  من التيروزين لكل ملتر من الفيسين البييسين على التوالي كما أظهرت دراسة التفاعلات أهمية روابط الهيدروجين , الكارهة للماء و روابط الكالسيوم في تكوين خثرة الحليب.

الأجبان الطرية من نوع " كاممبير " المحصل عليها من الفيسين و البييسين أظهرت تشابه كبير في اللون والرائحة والطعم مقارنة بالأجبان الشاهدة (بديل ذو أصل بكتيري) . ومع ذلك تمت ملاحظة بعض الاختلافات على مستوى المرارة والملح لكل من الانزيمين. من ناحية أخرى فقد سجلنا مردود يقدر بـ 33.25 % و 37.82 % في حالة الفيسين و البييسين على التوالي . هذا المردود يعتبر منخفض نسبيا مقارنة بمردود الجبن التحكم الشاهد والذي هو بقيمة 38.41 % .

هذه النتائج تعكس إمكانية استبدال البريزور بمستخلص الفيسين و / أو بييسين الدجاج في صنع الجبن . ومع ذلك، فإن هذه الدراسة ينبغي أن تمتد إلى أنواع أخرى من الأجبان مع السعي من أجل تحسين مردود ونوعية الجبن المحصل عليها.

---

الكلمات الدالة: الفيسين ، بييسين الدجاج ، بدائل الأنفحة ، توصيف ، التفاعلات ، الجبن الطري.

## Résumé

L'objectif du présent travail est la caractérisation de la ficine extraite du latex du figuier (*Ficus carica*) et de la pepsine extraite des proventricules de poulet. Cette caractérisation a visé principalement la détermination de l'activité et de la force coagulante. Aussi, l'activité protéolytique et les types d'interactions impliqués dans la formation des gels par comparaison à la présure animale ont été étudiés.

D'autre part, un essai de l'utilisation de la ficine et de la pepsine dans la coagulation du lait en tant que succédané de présure pour la préparation d'un fromage à pâte molle type « Camembert » a été réalisé.

Les principaux résultats obtenus ont montré que l'extrait de ficine présente une activité coagulante de 121,69 U.P. et une force coagulante de 1/42059. Pour la pepsine de poulet l'activité coagulante est de 18,61 U.P. et la force coagulante de 1/6041. En plus, l'activité protéolytique a été estimée à 469,7 µg et à 117 µg d'équivalent tyrosine par ml d'enzyme pour la ficine et la pepsine respectivement. L'étude des interactions impliquées dans la formation des gels ficine et pepsine a montré la prépondérance des liaisons hydrophobes, suivi des liaisons hydrogènes puis des liaisons calciques.

Les fromages à pâte molle type « Camembert » obtenus avec la ficine, ou la pepsine ont présenté de grandes ressemblances sur le plan couleur, odeur et goût comparativement au fromage témoin (succédané d'origine microbienne). Néanmoins, certaines différences ont été constatées notamment au niveau amertume et texture pour les deux enzymes. Nous signalons d'autre part, que les rendements fromagers sont de 33,25% et 37,82% dans le cas de la ficine et de la pepsine respectivement. Ces rendements sont relativement faibles par rapport à celui du fromage témoin évalué à 38,41%.

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

---

**Mots clés :** Ficine, pepsine de poulet, succédané de présure, caractérisation, interactions, fromage à pâte molle.