

Université Abdelhamid Ibn Badis

Mostaganem

Faculté des Sciences de la

Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

SENOUCI Ouissam

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et Transformation Laitières

Thème

**APPRECIATION D'UNE ENZYME COAGULANTE EXTRAITE DU
FIGUIER : LA FICINE DANS LA COAGULATION DES LAITS
FROMAGEABLES**

Soutenu publiquement le 02/07/2023

Devant les membres du jury :

| | | | |
|---------------------|------------------------------|-------------------------|---------------|
| Président | Dr DAHOU Abdelkader El amine | Maître de conférences A | U. Mostaganem |
| Examineur | Dr ZABOURI Younes | Maître de conférences A | U. Mostaganem |
| Encadreur | Dr TAHLAITI Hafida | Maître de conférences A | U. Mostaganem |
| Co-encadrant | BEKIHAL Amine | Doctorant | U. Mostaganem |

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales

Année universitaire 2022-2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de nous avoir données le courage, la force, la santé et la persistance et de nous avoir permis de finaliser cette étude dans de meilleurs conditions.

La première personne à qui nous voudrions exprimer notre gratitude et notre appréciation et nos sincères remerciements c'est Madame **TAHLAITI HAFIDA**, pour sa confiance et ses conseils, pour sa patience, sa compréhension et ses encouragements. Car elle nous aidé à accomplir notre mémoire dans les circonstances les plus favorables et pour l'attention toute particulière qu'elle a porté à cet humble travail, qu'il soit le témoignage de notre plus profonde gratitude et de notre respect.

On tient également à exprimer nos vifs remerciements aux membres du jury, « **Dr DAHOU A** » Président et pour « **Dr ZABOURI Y** », examinateur, pour leur générosité et l'honneur d'accepter la discussion et l'enrichissement de ce travail par leurs connaissances et leurs propositions. Nous vous adressons nos plus chaleureux remerciements.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à l'ingénieur de laboratoire des recherches des sciences et techniques de production animale **M BENHARRAT.N**.



Sans oublié nous Co-encadreur **Mr. Bekihal amine**, doctorante à l'université de Mostaganem, qui m'a supervisée tout au long de ce travail et qui m'a aidée par son savoir et son expérience.

A tous les enseignants du parcours, nos honorables professeurs qui ont supervisé notre enseignement et notre formation durant toutes ces années universitaires.

J'adresse mes plus vifs remerciements mes parents, et mes proches pour leur soutien et leur patience.

Je tiens aussi à remercier énormément mes chers collègues et amis qui ont rendu ma vie quotidienne agréable durant les mois de stage.

A la fin, un grand merci à tous ceux qui ont contribué d'une façon ou d'autres, de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire de fin d'étude.



Dédicace

Au nom d'Allah, Le Clément, Le Miséricordieux « Gloire à Toi ! Nous n'avons de savoir que ce que tu nous as appris. Certes c'est Toi L'Omniscient, le Sage » : Sourate 2, Verset 32
(**Saint Coran**).

Louange et Gloire à Dieu, le Tout Puissant, qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail.

Prière et bénédictions d'Allah sur le prophète Mohamed, Paix et Salut sur lui, le sceau des prophètes, ainsi que ses compagnons, pour nous avoir apporté une religion comme l'Islam.

Nous adressons également nos sincères remerciements aux généreux parents, que Dieu prolonge leur vie, Merci à tous les frères et sœurs.

Je me dois d'avouer pleinement ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont soutenue durant mon parcours, qui ont su me hisser vers le haut pour atteindre mon objectif. C'est avec amour, respect et gratitude que je dédie ce modeste travail :

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore « **Latifa** ».

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de Bonheur à toi mon père « **Rachid** ».

Merci beaucoup à tout l'encouragée, pour leurs sacrifices, leurs soutiens et leurs précieux conseils, grâce à vous je suis devenue ce que je suis aujourd'hui. Qu'**ALLAH** vous bénisse et vous accorde une longue et heureuse vie.

A mes adorables sœurs, **Nerimane** comme une deuxième maman pour moi, **Amina** ma sœur et ma jumelle je ne peux pas m'imaginer sans elle, **Wafaâ** ma petite, et **Nour El Houda** Ma sœur et mon amie que je ne retrouverai pas comme elle.

A mon cher adorable frère, le support de ma vie **Mohamed El Amine**.

A mes petits anges **Adem** et **Israâ**.

A toute les membres de ma famille **SENOUCI** et **AMMOUR** qui m'ont aidé chacun, de son côté, mes cousines et cousins.

A tous ceux qui m'aiment et que j'aime.

OUISSAM



Résumé

Ce travail est articulé autour de deux axes de recherche. Le premier concerne les analyses physico-chimiques du lait et le second est la caractérisation des enzymes coagulantes qui sont capables de succéder à la présure par la ficine à partir du latex du figuier. Nous avons approché les temps technologiques de coagulation représentés par la floculation et la prise, l'activité protéolytique a été contrôlée par la cinétique de la coagulation. Les résultats obtenus ont montré la conformité des temps de floculation respectant la norme FIL entre 8 et 15 minutes pour la présure et de même pour les enzymes extraites d'origine végétale (ficine) qui ont donné des résultats presque similaires. L'enzyme extraite de figuier possède une activité coagulante moyenne (UAC) égale à 1,33, et la présure égale 2,22. Les caillés fromagers obtenus avec ces extraits d'enzymes présentent une activité coagulante proche à celle obtenue par la présure commerciale, le rendement fromager est aussi relativement similaire.

Ces résultats préliminaires permettent d'envisager des essais semi-industriels par le remplacement potentiel de la présure commerciale par cet extrait enzymatique (figuier) dans la fabrication des fromages, tout en prenant en compte la caractérisation des paramètres technologiques adéquats afin d'obtenir le caillé.

Mots clés: coagulation du lait, ficine, présure commerciale, Caillé fromager, Lait reconstitué.

ملخص

يتم توضيح هذا العمل حول خطين من البحث، الأول يتعلق بالتحليلات الفيزيائية الكيميائية للحليب والثاني هو توصيف الإنزيمات المتخثرة القادرة على استبدال الشبكة بالفيسين من اللاتكس في شجرة التين. لقد اقتربنا من الأوقات التكنولوجية للتخثر المتمثلة في التكتل والامتصاص، وكان نشاط انحلال البروتين يتحكم فيه حركية التخثر. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن أوقات التكتل تفي بمعيار FIL بين 8 و 15 دقيقة لمنفضة الشبكة وأيضًا للإنزيمات المستخرجة من النباتات (ficin) والتي أعطت نتائج مماثلة تقريبًا. إنزيم التين المستخرج له نشاط خثري متوسط يبلغ 1.33 و منفحة تجارية 2.22. تتميز خثارة الجبن التي يتم الحصول عليها باستخدام مستخلصات الإنزيم هذه بنشاط متخثر قريب من النشاط الذي يتم الحصول عليه بواسطة الشبكة التجارية، كما أن محصول الجبن مشابه نسبيًا تتيح هذه النتائج الأولية تصور الاختبارات شبه الصناعية عن طريق الاستبدال المحتمل للمخثرة التجارية بهذا المستخلص الأنزيمي (شجرة التين) في صناعة الجبن، مع مراعاة توصيف المعلمات التكنولوجية المناسبة من أجل الحصول على الخثارة.

الكلمات المفتاحية: تخثر الحليب، فيسين، منفحة تجارية، خثارة الجبن، الحليب المعاد تشكيله.

Abstract:

This work is articulated around two lines of research, the first concerns the physico-chemical analyses of milk and the second is the Characterization of coagulant enzymes that are capable of rennet substitute by the ficina from the latex of the fig tree. We approached the technological times of coagulation represented by flocculation and uptake, proteolytic activity was controlled by the kinetics of coagulation. The results obtained showed that the flocculation times met the FIL standard between 8 and 15 minutes for rennet and also for enzymes extracted from plants (ficin) which gave almost similar results. The extracted fig enzyme has a mean coagulant activity (AUC) of 1.33 and rennet 2.22. Cheese curds obtained with these enzyme extracts have a coagulant activity close to that obtained by commercial rennet, the cheese yield is also relatively similar.

These preliminary results make it possible to envisage semi-industrial tests by the potential replacement of commercial rennet by this enzymatic extract (fig tree) in the manufacture of cheeses, while taking into account the characterization of the appropriate technological parameters to obtain the curd.

Keywords: milk coagulation, ficina, commercial rennet, cheese curd, reconstituted milk.

Liste des Figures

- **Figure01:** Appareil digestif du poulet.....07
- **Figure02:** Arbre de figuier.....09
- **Figure03:** Image représentative du liquide blanc du figuier (latex) 10
- **Figure04:** Phases de coagulation de lait et formation de réseau..... 13
- **Figure 05:** Hydrolyse de la caséine κ par la prure..... 14
- **Figure06:** Formation d'un caillé présure par action de la présure sur les caséines du lait..... 15
- **Figure 07:** Facteurs influençant les paramètres de coagulation enzymatique du lait..... 17
- **Figure 08:** Situation géographique de laboratoire de recherche LSTPA de l'université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem (Google maps) 19
- **Figure09 :** Lait reconstitué20
- **Figure10 :** Lactoscan. 21
- **Figure 11 :** Mesure de l'acidité Dornic23
- **Figure 12:** Répartition du lait et ajout des différentes doses des extraits d'enzymes.....24
- **Figure 13 :** Méthodologie d'ajout d'enzymes au lait.....24
- **Figure 14 :** Aspect de détermination du temps de floculation.....25
- **Figure 15 :** Aspect de détermination du temps de prise 26
- **Figure 16 :** pH-mètre 28
- **Figure 17 :** Dessiccateur 29
- **Figure 18 :** Filtration du caillé obtenu..... 31
- **Figure 19 :** Rendement fromager en % pour les différentes doses de l'enzyme extraite de figuier (ficine). 36
- **Figure 20 :** Rendement fromager en % pour les différentes doses de présure commerciale36

Liste des Tableau

| N° | Titre | Page |
|-------------------|---|------|
| Tableau 01 | Origine de différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait. | 04 |
| Tableau 02 | Résultats des analyses physico-chimiques du lait reconstitué en (%). | 32 |
| Tableau 03 | Temps de coagulation pour l'enzyme extraite de figuier (ficine). | 33 |
| Tableau 04 | Temps de coagulation pour la présure commerciale. | 33 |
| Tableau 05 | Unité d'activité Coagulante « U.A.C » pour les différentes doses de l'enzyme extraite de figuier (ficine). | 33 |
| Tableau 06 | Unité d'Activité Coagulante « U.A.C » pour les différentes doses de présure commerciale. | 34 |
| Tableau 07 | La force enzymatique pour les différentes doses De l'enzyme extraite de figuier (ficine). | 34 |
| Tableau 08 | La force enzymatique pour les différentes doses de présure commerciale. | 34 |
| Tableau 09 | Résultats des analyses physico-chimiques de différentes doses de l'enzyme extraite de figuier (ficine). | 35 |
| Tableau 10 | Résultats des analyses physico-chimiques de différentes doses de présure commerciale. | 35 |
| Tableau 11 | Résultats de NT et NPN pour les différentes doses de la ficine . | 35 |
| Tableau 12 | Résultats de NT et NPN pour les différentes doses de la presure. | 36 |

Liste des Abréviations

°C : Degré Celsius.

AC: Activité Coagulante.

AFNOR : Association française de normalisation.

CMP : Caséino-macropéptide.

Cys : la Cystine.

EST: Extrait Sec Total.

F: Force de l'enzyme.

FAO: Food and agriculture organisation.

FIL : Fédération Internationale du Lait.

MG : Matière Grasse.

MP : Matière Protéique.

MS : Matière Sèche.

NPN : Azote non protéique (non protéique nitrogène).

NT : Azote total (total nitrogène).

OMS : Organisation mondiale de la santé.

PH: potentiel hydrogène.

R% : Le rendement en fromage en %.

T° : Température.

U.A.C : Unité d'activité coagulante.

V : Volume du lait.

V': Volume de l'extrait enzymatique.

κ : kappa.

κ-CN : kappa caséine.

Table des matières

| | |
|------------------------|--|
| Dédicace | |
| Remerciements | |
| Résumé | |
| ملخص | |
| Abstract | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des figures | |
| Liste des abréviations | |

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|--|----|
| Introduction générale..... | 01 |
| Chapitre I. les enzymes coagulants | |
| 1. Enzymes coagulantes | 03 |
| 2. Origine..... | 03 |
| 2.1. Les enzymes d'origine animale | 03 |
| 2.2. Enzymes d'origine microbienne | 03 |
| 2.3. Enzymes d'origine végétale | 04 |
| 3. Présure et succédanés de présure | 05 |
| 3.1. La présure | 05 |
| 3.1.1. Chymosine EC.3.4.23.4 | 05 |
| 3.1.2. Pepsine EC.3.4.23.1 | 05 |
| 3.2. Succédanés de présure | 06 |
| 3.2.1. Succédanés d'origine animale | 06 |
| a. Pepsine porcin | 06 |
| b. Pepsine de poulet..... | 06 |
| 3.2.2. Succédanés d'origine végétale..... | 07 |
| a. Généralité sur le figuier | 08 |
| b. Aspect physiologique de figuier | 09 |
| c. Le latex | 09 |
| d. Caractéristiques de la ficine EC 3.4.22.3. | 10 |
| e. Utilisation de la ficine..... | 10 |
| Chapitre II. La coagulation du lait | |
| 1. Mécanismes de la coagulation | 12 |
| 2. Coagulation du lait | 12 |
| 2.1. Définition La coagulation..... | 12 |
| 2.2. Différents types de coagulation | 12 |
| 2.2.1. Coagulation acide | 12 |
| 2.2.2. Coagulation mixte..... | 12 |
| 2.2.3. Coagulation enzymatique | 13 |
| 3. Etapes de coagulation..... | 13 |
| 3.1. Phase primaire | 13 |
| 3.2. Phase secondaire..... | 14 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| 3.3. Phase tertiaire | 14 |
| 4. Facteurs influençant | 15 |
| 4.1. Concentration en enzyme | 16 |
| 4.2. Température..... | 16 |
| 4.3. pH..... | 16 |
| 4.4. Teneur en calcium | 16 |
| 4.5. Teneur en caséines..... | 16 |
| 4.6. Dimension des micelles..... | 17 |
| 5. Evaluation de la coagulation | 17 |
| 5.1. Temps de coagulation..... | 17 |
| 5.2. Temps de prise..... | 18 |
| 5.3. Activité coagulante..... | 18 |
| 5.4. Force coagulante..... | 18 |

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériels et Méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Objectifs de l'étude | 19 |
| 2. Lieu et durée du travail..... | 19 |
| 3. Produits utilisés | 20 |
| 4. Techniques d'analyse | 21 |
| 4.1. Caractérisation du lait reconstitué | 21 |
| 4.1.1. Analyses physico-chimiques du lait..... | 21 |
| 4.1.2. Détermination de l'acidité titrable..... | 22 |
| 4.2. Caractérisation de l'extrait enzymatique | 24 |
| 4.2.1. Les laits fromagers | 24 |
| 4.2.2. Détermination des temps de coagulation | 25 |
| 4.2.2.1. Détermination du temps de floculation | 25 |
| 4.2.2.2. Détermination du temps de prise..... | 26 |
| 4.2.3. Activité coagulante | 26 |
| 4.2.4. Force coagulante | 27 |
| 4.2.5. Mesure du pH des extraits enzymatiques..... | 27 |
| 4.2.6. Détermination de l'extrait sec | 28 |
| 4.3. Cinétique de la protéolyse (NT/NPN)..... | 29 |

Chapitre II : Résultats Et Discussion

| | |
|--|----|
| I. Résultats..... | 32 |
| 1. Les résultats des analyses physico-chimiques..... | 32 |
| 2. Suivi du temps de coagulation et tests enzymatiques | 33 |
| 3. Détermination de l'activité coagulante | 33 |
| 4. Détermination de la force de l'enzyme | 34 |
| 5. Détermination de ph et l'extrait sec total après la coagulation | 35 |
| 6. Cinétique de la protéolyse | 35 |
| II. Discussion..... | 37 |

| | |
|---------------------------|----|
| Conclusion Générale | 39 |
|---------------------------|----|

Références Bibliographiques.

Annexes



Introduction

Le lait, par ses grandes qualités nutritionnelles, a toujours été considéré comme un produit noble. En effet, c'est un aliment indispensable dans les premiers mois de la vie et fondamental dans la vie de l'homme. Son altération rapide par son instabilité biologique et physico-chimique constitue un facteur limitant de son utilisation en l'état. C'est dans ce contexte que sont apparues pour garantir sa conservation et sa meilleure utilisation les premières transformations fromagères.

L'objectif principal de la fabrication de fromage à partir de lait était de conserver les éléments essentiels du lait (**Eck & Gillis, 2006**). La coagulation, étape initiale de la fabrication du fromage, est considérée comme le secret de toute préparation réussie. Il s'agit de la création d'un gel à la suite de modifications physiques et chimiques des micelles de caséine. Le coagulant le plus utilisé pour la coagulation du lait est la présure de veau (**Eck & Gillis, 2006**).

Ces raisons ont fait que de nombreuses recherches ont été entreprises afin de trouver des succédanés efficaces et compétitifs utilisables industriellement il faut tenir compte non seulement de l'activité coagulante, mais aussi de son activité protéolytique non spécifique, dans les conditions de pH et de température qui se présentent en fromagerie (**Alais, 1984**). 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 bovines et les pepsines extraites des pro-ventricules des volailles (**Siar, 2014**).

Bien que notre pays dispose d'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 (**Siar, 2014**).

Le coût élevé des importations (plus de 102 millions de dollars) et la dépendance de l'Algérie vis-à-vis des fournisseurs étrangers pour l'approvisionnement de la présure et/ou de ses alternatives. Nous avons été encouragés à mettre en évidence les sources locales pour la production de facteurs de coagulation utilisables dans l'industrie fromagère, que nous avons

l'intention de rechercher, à partir de ressources brutes d'origine locale, qui sont abordables, facilement disponibles et peu appréciées dans notre pays (**Siar, 2014**).

Notre travail a pour objectif de ce travail est d'étudier la possibilité de substituer la présure par la ficine extraite du latex de figuier comme agent coagulant du lait.

Notre étude s'articulera en quatre chapitres :

- Le premier chapitre présente les enzymes coagulants
- Le deuxième chapitre présente la coagulation du lait
- Le troisième chapitre présente les diverses méthodes utilisées dans cette étude ;
- Le quatrième chapitre est consacré aux différents résultats obtenus à partir des paramètres physicochimiques du lait ainsi que les résultats de coagulation par les deux extraits enzymatiques.

Enfin, on termine par une conclusion de ce travail.



PREMIERE PARTIE
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE





Les Enzymes Coagulants

1. Enzymes coagulantes

Les enzymes sont des catalyseurs biochimiques de nature protéique qui interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergétiquement possibles, qu'elles accélèrent par activation spécifique dans des conditions douces de température et de pH. Ce sont des outils clés de la biotechnologie et de la bio-industrie. Un grand nombre d'enzymes protéolytiques, qui ont la propriété de coaguler le lait, sont présentés dans le tableau 01 (Cuvellier, 1993).

2. Origine

A nos jours, l'évolution de la consommation mondiale de fromage a nécessité le développement de coagulants de plus en plus spécifiques, afin de répondre à des demandes industrielles adaptées aux différents marchés, aux réglementations, à l'amélioration des qualités de tranchage, ainsi qu'au rendement fromager et à la qualité des lactosérums. Il existe sur le marché quatre origines différentes de coagulants : animale, végétale, microbienne et la plus récente issue de fermentation à partir de micro-organismes intégrant de l'ADN d'origine animale (ROSET, 2019).

Les enzymes d'origine animale

Ce sont des protéases gastriques. Les plus employés sont la présure (constitué principalement de chymosine et pepsine); bovine, porcine et de poulet. Ces protéases sont formées à partir d'un précurseur (zymogène), forme inactive, secrété par la muqueuse gastrique (Payne, 2009).

Enzymes d'origine microbienne

Les coagulants d'origine microbienne sont des enzymes protéolytiques produites par des micro-organismes capables d'induire la coagulation du lait de manière similaire aux coagulants d'origine animale. Un grand nombre de champignons secrètent des protéases à acide aspartique dans le milieu de culture. La fonction physiologique de ces enzymes est la hydrolyse de protéines pour répondre aux besoins nutritionnels (Arab, Idres, 2021).

Les bactéries les plus utilisées sont *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus sphaericus* (El-Bendary et al., 2007). Elles secrètent des protéases, des amylases et des saccharases.

Les enzymes fongiques les plus connues sont celles issues de *Cryphonectriaparasitica*

(Trujillo et al., 2002; Kim et al., 2004), Endothiaparasitica ou moisissure parasite du châtaignier, Mucor miehei ou moisissure banale thermophile du sol ou Rhizomucormiehei (Trujillo et al, 2002; Reys et al., 2006).

Enzymes d'origine végétale

Les protéases d'origine végétale sont par ordre d'intérêt en technologie laitière : la papaïne extraite d'une plante équatoriale et tropicale (Caricapapaya), la broméline extraite de l'ananas (Ananas comosus) et la ficine issue de la figue (**Ficus glabrata**) (Cuvelier, 1993). La ficine est une sulfhydryl enzyme, extraite du latex de Ficus genus ou Ficus carica. Comme la papaïne, elle a un pouvoir coagulant important mais son utilisation est limitée par son fort pouvoir protéolytique (Siar, 2014).

Tableau 01 : Origine de différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait (Boughellout, 2007).

| Origines | | Enzymes |
|------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| Animaux | Ruminants : -veau..... | CHYMOSINE+ Pepsine |
| | -chevreau..... | CHYMOSINE + Pepsine |
| | -agneau..... | CHYMOSINE + Pepsine |
| | -bovin..... | PEPSINE+Chymosine |
| | -adulte..... | PEPSINE+Chymosine |
| | Monogastrique : -porc..... | PEPSINE porcine |
| | -poulet..... | PEPSINE de poulet |
| Végétaux | Figuier (suc)..... | Ficine |
| | Chardon-Artichaud (panicule).... | Broméline |
| | Gaillet (caille lait) | |
| | Etc.... | |
| Microbienne | Moisissure : -mucor miehei? | Protéases de mm |
| | - mucorpusillus..... | Protéases de Mp |
| | - cryphonectria..... | Protéases de Cp |
| Microbienne (par clonage) | Moisissure: -aspergillus awamoris | CHYMOSINE |
| | Levures : -kluveromyceslactis.... | Bovines |
| | Bactéries :-E. coli K12 | Issues d'OGM |

3. Présure et succédanés de présure

La présure

La dénomination « présure » est donnée à l'extrait coagulant provenant de caillottes de jeunes ruminants (Bovins) abattus avant sevrage. De nos jours on l'utilise toujours en technologie fromagère, principalement sous forme liquide ou en poudre. La présure est constituée en majorité de chymosine, de pepsine et de trypsine en moindre quantité (**Berridge, 1955**) sécrétées dans le quatrième estomac des ruminants non sevrés. Ces enzymes font partie de la famille des protéinases aspartiques car elles possèdent deux résidus caractéristiques dans leur site actif. Chez l'animal, ces protéinases sont sécrétées sous la forme de précurseurs, la prochymosine et le pepsinogène, dans le mucus stomacal pour but de digérer le lait maternel (**Luquet, 1985**).

Les précurseurs sont appelés zymogènes et possèdent une région N-terminale qui va se loger dans leur site actif, les zymogènes sont ainsi auto-inactivés. Après leur sécrétion, les précurseurs sont activés suite à la perte d'une partie de leur région N-terminale. Cette réaction d'activation est effectuée par les conditions acides rencontrées dans l'estomac suite à différents changements conformationnels ainsi que des clivages inter et intra moléculaires [1]. La présure est constituée de deux enzymes bien distinctes la Chymosine et la Pepsine.

Chymosine EC.3.4.23.4

La Chymosine est la protéase majeure responsable de l'activité coagulante totale. Elle est sécrétée inactive sous forme de prochymosine dans la caillotte sous l'action de l'acidité sécrétée par cet organe, il y aura transformation en chymosine active (**Abdellaoui, 2007**).

Pepsine EC.3.4.23.1

La pepsine est sécrétée en proportions plus importantes après sevrage, dès que la ration alimentaire renferme des aliments solides et que le jeune animal commence à brouter, la proportion de chymosine chute très fortement, c'est pourquoi la présure a toujours été extraite de jeunes ruminants avant sevrage (**Eck & Ghilis, 2006**). A l'opposé de la chymosine, la pepsine possède une activité protéolytique élevée et une faible activité coagulante, 20% de l'activité coagulante est assurée par la pepsine dans la fabrication fromagère. La présure joue

un rôle important sur les caractéristiques sensorielles des fromages produits (**Eck & Ghilis, 2006**).

Succédanés de présure

La forte demande de la présure par les industries fromagères et le prix relativement élevé de ce coagulant ont conduit à l'approvisionnement de plus en plus difficile de la présure traditionnelle. Par ailleurs, dans certains pays, pour des raisons philosophiques ou religieuses, l'utilisation de la présure est interdite. A cet égard, des recherches ont été entreprises, ces dernières années, afin d'exploiter d'autres sources potentielles de coagulases capables de remplacer la présure désignées sous le terme de succédanés de présure [1].

Succédanés d'origine animale

a. Pepsine porcine

La pepsine porcine est produite à partir de la muqueuse gastrique du porc. Elle est formée de 321 résidus d'acides aminés. 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 $T^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$) la pepsine porcine est partiellement inactivée et après une heure elle perd 50 % de son activité ainsi que sa forte activité protéolytique (**Cuvellier, 1993**).

b. Pepsine de poulet

Dans le tube digestif de poulet, la pepsine est sécrétée au niveau du proventricule qui est située légèrement à gauche dans la cavité abdominale entre le jabot et le gésier (Fig. 1). C'est un ronflement fusiforme (de 3 cm de long en moyenne chez la poule) dont la muqueuse est très riche en glandes à mucus. La paroi interne, très épaisse, est formée de lobules dont chacun constitue une glande composée, disposée radialement à l'axe de l'organe. Ces glandes en tube ont des orifices formant des rangées de mamelons visibles à l'œil nu. Les alvéoles de ces glandes sont bordées de cellules très spécialisées sécrétant à la fois de l'acide chlorhydrique et une proenzyme protéolytique : le pepsinogène (**Adoui, 2014**).

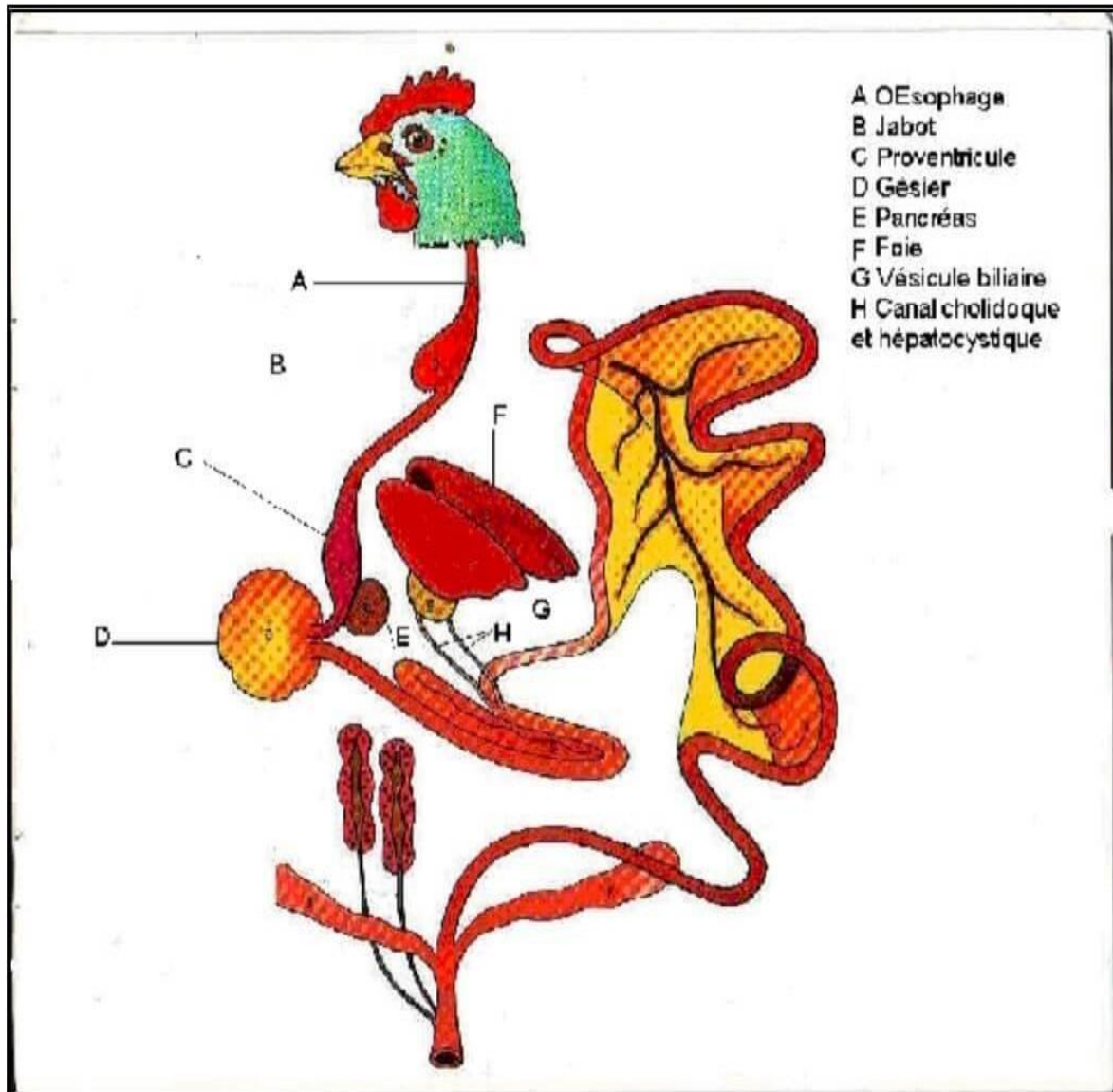


Figure 01: Appareil digestif du poulet (Alamareot, 1982).

Succédanés 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. De très nombreuses préparations coagulantes sont issues du règne végétal (Eck et Gillis, 2006). L'Espagne et le Portugal ont la plus grande production de variété de fromages en utilisant l'extrait de *Cynara* (feuilles d'artichaut) comme agent coagulant. Ces extraits sont utilisés dans la fabrication des fromages portugais Serra et Serpa et l'Espagnol de Los Pedroches. Dans les régions chaudes plusieurs plantes renferment des principes coagulants tels que la ficine provenant du latex du figuier, la papaine issue de papayer et la bromélaïne

issu du l'ananas. Toutefois, la nature protéolytique excessive de la plupart des coagulants végétaux a limité leur utilisation dans la fabrication des fromages en raison de rendement fromagère réduit et des défauts de saveur et de texture (**Eck et Gillis, 2006**).

a-Généralité 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 est ficus (**Siar, 2014**). Du point de vue systématique, la classification botanique du figuier :

- Règne : **Végéta**
 - Embranchement : **Phanérogames**
 - Sous embranchement : **Angiospermes**
 - Classe : **Dicotylédones**
 - Sous classe : **Hamamélidées**
 - Série : **Apétales unisexuées**
 - Ordre : **Urticales**
 - Famille : **Moracées**
 - Genre : **Ficus**
 - Espèce : **Ficus carica L**
- Selon **Vilmorin, (2003)** rapporte qu'il est originaire d'Asie occidentale, d'Afrique du 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 (**Siar, 2014**).



Figure02: Arbre de figuier (Khelil et Taleb, 2017).

b. Aspect physiologique de figuier

Ficus carica possède une étonnante capacité de régénération végétative et de production de fruit sans production de fleurs visibles. Le figuier possède deux espèces les bifères avec deux production : figues de première récolte ou figues fleurs (El bakkor) et figues de deuxième récolte ou figues d'automne (karmouce) et les unifères avec une seule production. L'évolution des figues fleurs ne nécessite pas de pollinisation et se fait d'une manière parthénocarpique (Oukabli, 2003).

c. Le latex

Le latex est un liquide visqueux de couleur blanche, il est largement distribué dans la plante. Ce matériel contient divers métabolites secondaires comme les composés phénoliques et des protéines à savoir les protéases à cystéine. Le latex est constitué de caoutchouc, résine, albumine, sucre et acide malique, enzymes protéolytiques, diastase, estérase, lipase, catalase

et peroxydase. Traditionnellement, il est utilisé dans le traitement de la goutte, des ulcères et des verrues. Il contient une enzyme protéolytique capable de coagulation de lait et de digérer la caséine (**Boukara M et Brahimi A, 2018**).



Figure3: Image représentative du liquide blanc du figuier (latex) (**Boukara M et Brahimi A, 2018**).

d. Caractéristiques de la ficine EC 3.4.22.3

La ficine est connu depuis bien d'années que le latex contient une activité protéolytique, elle appartient à la famille des protéases à cystéine. Les informations disponibles indiquent que la ficine a beaucoup de propriétés communes avec la papaine. Il s'agit d'une seule chaîne polypeptidique composée de 210 résidus d'acides aminés. Son site actif est constitué de deux acides aminés qui sont la cystéine et l'histidine. La ficine présente une grande stabilité thermique. Sa température d'activité est comprise entre 67 et 77 C°. L'activité maximale de la ficine est obtenue dans une gamme de pH de 5 à 8,5 (**Siar, 2014**).

e. 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, dans le secteur de la brasserie afin d'obtenir de bonnes propriétés colloïdales à de basses températures, ou dans le domaine pharmaceutique, la ficine est aussi utilisée pour

l'attendrissement de la viande. 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 (**Siar, 2014**)



La Coagulation Du Lait

1. Mécanismes de la coagulation

Selon (Cecchinato *et al.*, 2012), la coagulation du lait est le résultat d'une transition irréversible d'un état liquide à un état semi-solide appelé gel ou coagulum. La capacité d'égouttage, les qualités finales du fromage et les propriétés physico-chimiques de l'état gélifié en font l'étape la plus cruciale pour un fromage réussi (Hsieh et Pan, 2012).

2. Coagulation du lait

Définition La coagulation

Est la première étape de transformation du lait en fromage. Cette coagulation se traduit par la formation d'un gel, résultant des modifications physico-chimiques intervenant au niveau des micelles de caséine. Les mécanismes proposés dans la formation du coagulum diffèrent totalement suivant que ces modifications sont induites par acidification ou par action des enzymes coagulantes [2].

Différents types de coagulation

Coagulation acide

En transformant biologiquement le lactose en acide lactique à l'aide de ferments lactiques, ou chimiquement en transformant le lactose en acide lactique en ajoutant un agent acidogène (glucono- γ -lactone) ou en ajoutant des protéines sériques à pH acide, les caséines sont précipitées à leur point isoélectrique ($pH_i = 4,6$). Le gel obtenu par acidification présente une grande friabilité mais une bonne perméabilité. Parce que le réseau n'est pas structuré, il a très peu d'élasticité, de flexibilité et de résistance aux traitements mécaniques (Abdellaoui, 2017).

Coagulation mixte

La coagulation mixte est réalisée par acidification du lait et adition des enzymes coagulantes. En pratique cette méthode est utilisée pour la fabrication des fromages frais ou fromages à pâte molle (boughellout, 2007). Le coagulum obtenu présente des caractères intermédiaires entre ceux du 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 (Jeantet *et al.*, 2008).

Coagulation enzymatique

La coagulation du lait par des enzymes protéolytiques est une des plus anciennes opérations de transformation alimentaire. Un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou microbienne, présente la propriété de coaguler le complexe caséinique (Kellil, 2015). La présure est l'enzyme coagulante la mieux connue et son mécanisme d'action est bien établi. Le processus de coagulation est influencé par la température, l'acidité et la teneur en calcium. La coagulation, provoquée par la présure (Fig. 04).

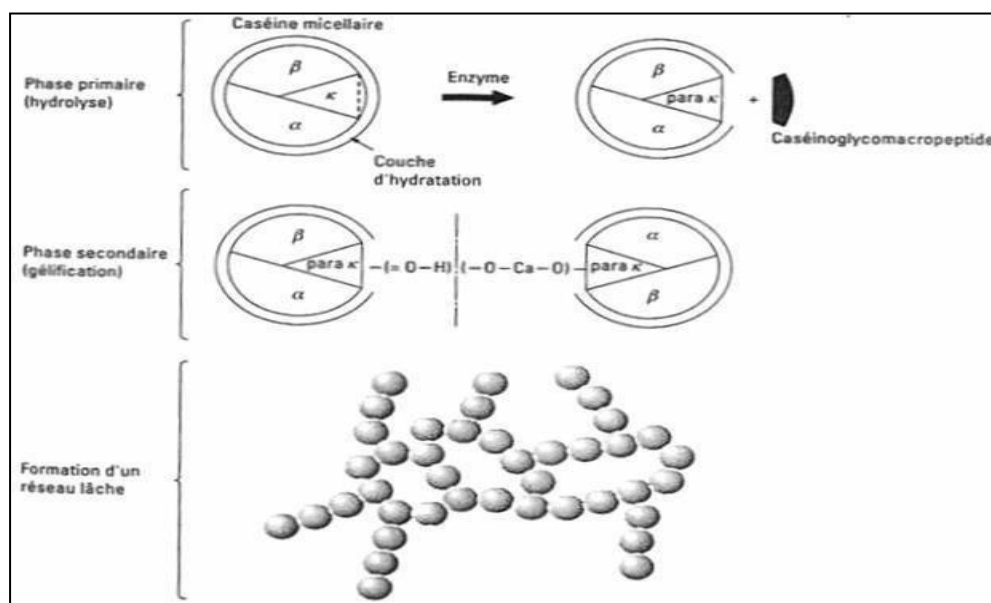


Figure04: Phases de coagulation du lait et formation de réseau (Khelil et Taleb, 2017).

3. Etapes de coagulation

Phase primaire

La micelle est principalement constituée de caséine κ avec son segment C-terminal hydrophile libre qui s'étend dans la phase aqueuse du lait assurant la stabilité stérique et agissant comme une barrière contre l'association des micelles (Eck et Ghilis, 2006). Au cours de la phase enzymatique (primaire), il y'a une attaque de l'enzyme sur la caséine- κ (composante qui stabilise la micelle) au niveau de la liaison PHE105-MET106. La chaîne peptidique se trouve ainsi coupée en deux segments, le segment 1-105 est la paracaséine- κ (Fig. 05) et le segment 106-169 qui est le caséinomacropeptide (CMP). La paracaséine- κ liée

aux caséines α et β reste intégrée à la micelle hydrophobe et le CMP contenant tous les glucides est libéré dans le lactosérum, ce qui entraîne une réduction de la charge négative et leurs degrés d'hydratation (**Lij et Daligleish, 2006**).

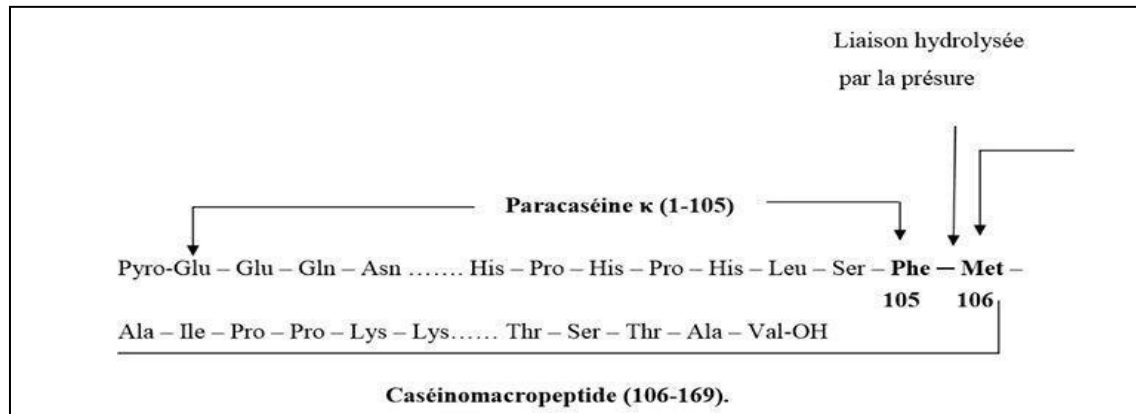


Figure05:Hydrolyse de la caséine κ par la présure (**Fox *et al.*, 1994**).

Phase secondaire

Cette phase commence dès que 85 % de la caséine- κ est hydrolysée. Elle est dite phase d'agglomération ou d'agrégation ou phase de coagulation proprement dit (**Lucey, 2002**). Durant laquelle la libération du macropeptide de la caséine- κ 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 (**Lucey, 2002**). La nature des interactions intervenant durant cette phase n'est pas encore bien connue. 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^{++}). Au début, il ya une formation de chaines linaires de micelles qui continuent de s'agréger pour former des amas. Ces derniers constituent le gel protéique qui se sépare nettement de lactosérum (**Lucey, 2002**).

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(**Vignola,2002**).

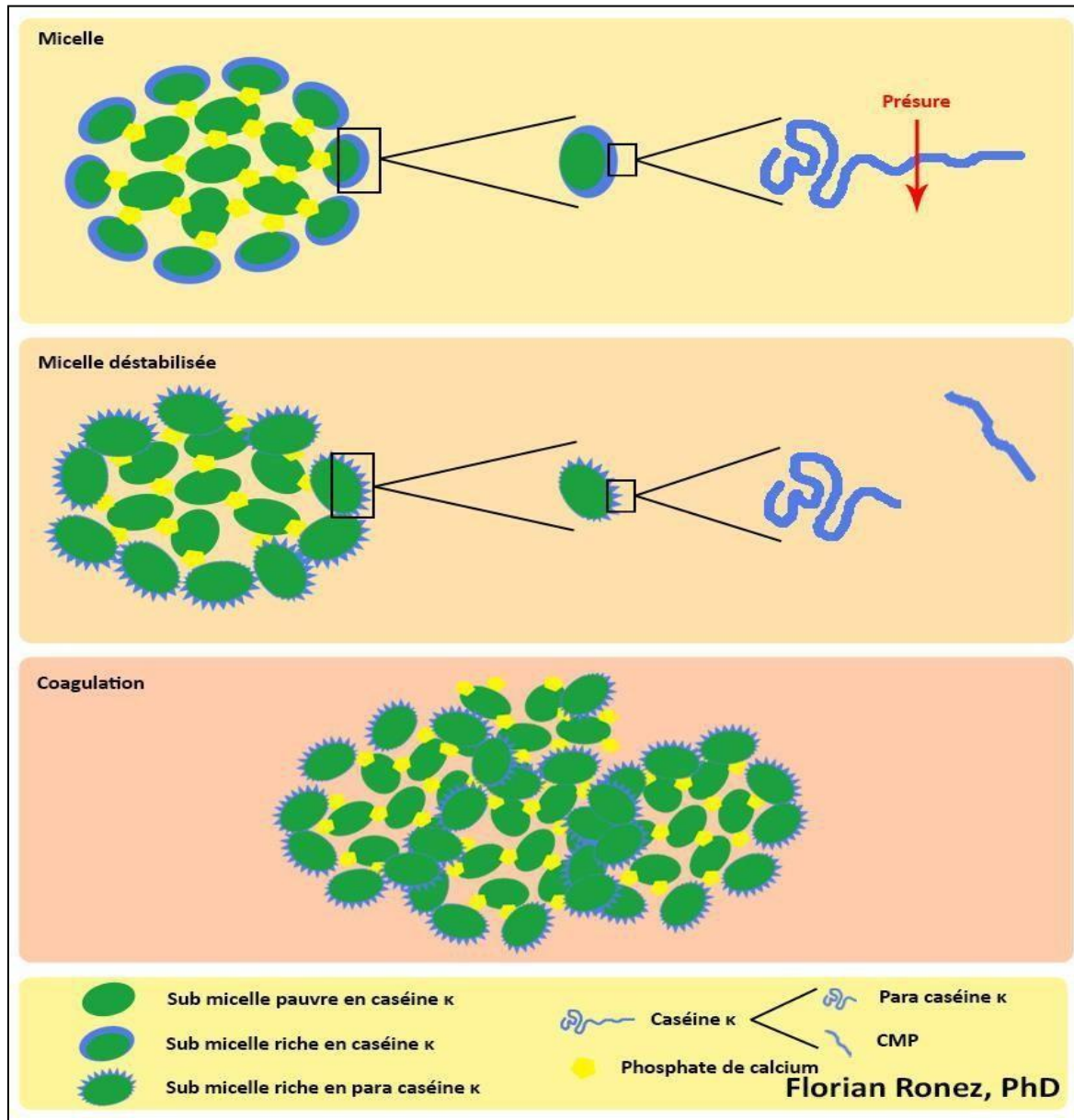


Figure06: Formation d'un caillé présure par action de la présure sur les caséines du lait (Florian , 2012).

4. Facteurs influençant la coagulation du lait

La coagulation du lait et les propriétés physiques des coagulums sont susceptibles de changer en fonction de diverses circonstances. Ces variables sont principalement liées à la taille des micelles, à la teneur en calcium, à la teneur en caséine, à la température, au pH et à la concentration en enzyme (Eck et Ghilis, 2006).

Concentration en enzyme

Le temps de coagulation et la concentration en enzyme sont négativement liés. Cependant, elle est proportionnelle au taux d'agrégation des micelles (phase physique) et au taux d'hydrolyse de la -caséine (phase enzymatique) (**Boughellout, 2007**).

Température

La température optimale d'activité de la chymosine et de la pepsine est de 40-42 C°. A cet intervalle de température, le temps de floculation est minimal, puis augmente aux températures plus élevées et devient nul à 65 C° où la présure est inactivée. On note que le temps de raffermissement du gel diminue avec l'élévation de la température (**Boughellout, 2007**).

pH

En passant de pH 6,7 à 5,6, la vitesse de coagulation est accrue. Ceci résulte d'un accroissement de la vitesse d'hydrolyse et par suite une augmentation de la vitesse de raffermissement du gel. La fermeté est significativement importante de pH 6,6 à pH 6,0 due à une plus grande disponibilité du calcium ionisé. Au-dessous de pH 6,0, la caséine se déminéralise et la désagrégation de la structure micellaire est accentuée jusqu'à devenir totale à pH 5,2 (**Boughellout, 2007**).

Teneur en calcium

La quantité et le type de calcium présent ont un impact significatif sur la réticulation du gel lors de la coagulation du lait induite par la présure, qui implique des liaisons phosphocalciques. Des temps de coagulation plus courts et une plus grande fermeté du gel sont produits par l'ajout de CaCl₂, ce qui augmente les quantités de calcium ionisé et de calcium colloïdal (**Kellil, 2015**).

Teneur en caséines

La vitesse d'hydrolyse enzymatique est proportionnelle à la teneur en protéines. Ainsi, la vitesse d'agrégation et la fermeté des gels augmentent avec la teneur des caséines (**Kellil, 2015**).

Dimension des micelles

La relation entre les dimensions des micelles et le temps de coagulation est proportionnelle. Pour les micelles de faible diamètre, riches en caséine κ , la vitesse d'hydrolyse est plus rapide (Kellil, 2015).

Les effets des facteurs principaux qui influencent les paramètres de coagulation sont résumés à la (figure07)

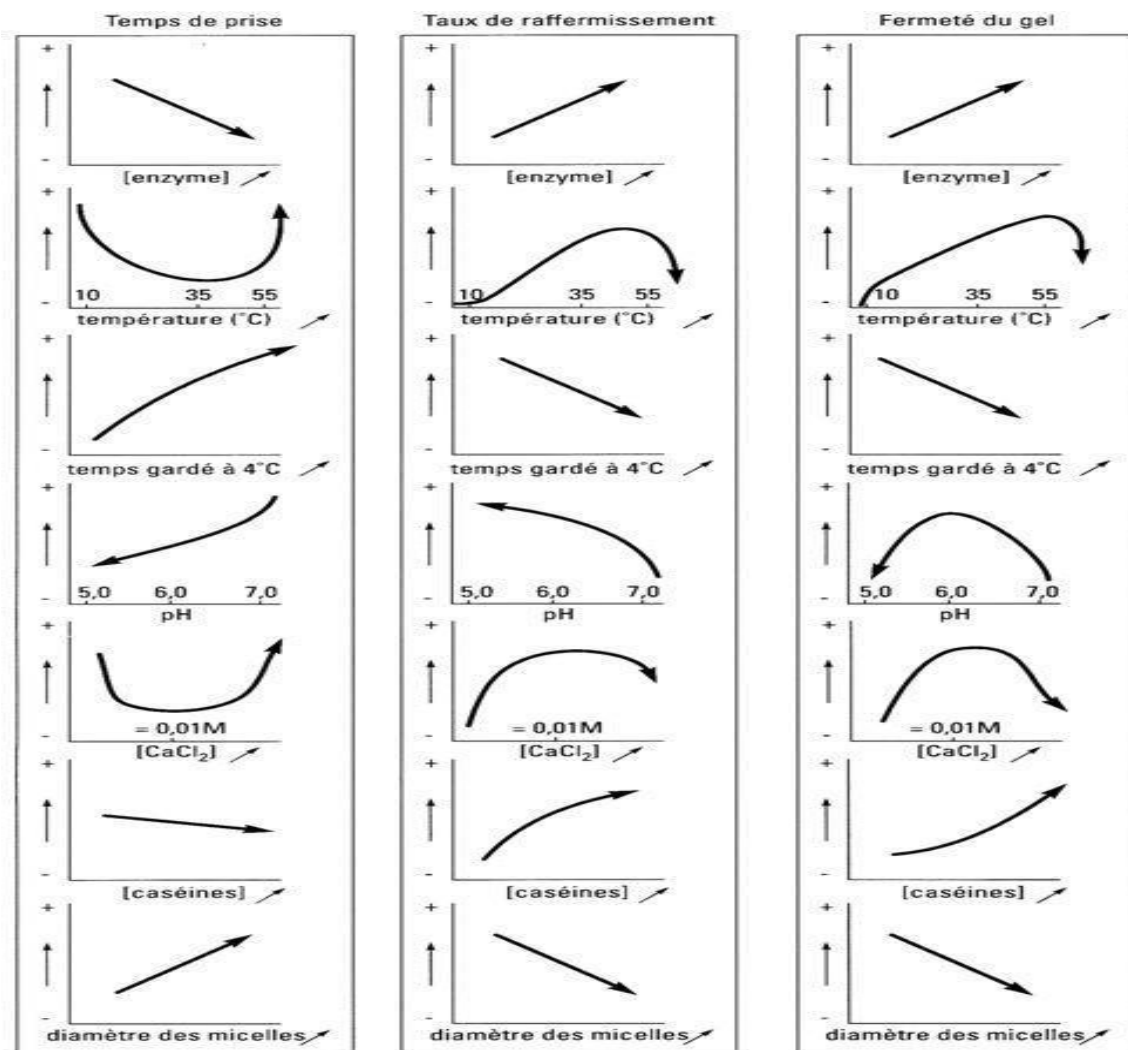


Figure07:Facteurs influençant les paramètres de coagulation enzymatique du lait (Khelil et Taleb, 2017).

5. Evaluation de la coagulation

Temps de coagulation

Le temps de coagulation correspondant au temps entre l'addition d'enzyme coagulante et le début de tranchage du gel (Eck et Ghilis, 2006).

Temps de prise

Le temps de prise ou durée de prise est le temps qui s'écoule entre l'emprésurage et le début de la floculation, c'est-à-dire, gélification apparente du lait (**Mahaut et al., 2000**).

Activité coagulante


L'activité coagulante est définie par l'unité présure (UP). Selon **Berridge (1955)**, cette unité correspond à la quantité d'enzyme contenue dans 1 centimètre cube (cm³), qui peut coaguler 10 centimètres cubes de substrat standard en 100 secondes à 30 C° (**Alais, 1984**).

Force coagulante

Les méthodes anciennes et les plus répandues ont été proposées par Soxhlet et Berridge. L'unité Soxhlet correspond au nombre d'unité de poids ou de volume du lait qui peuvent être coagulés par une unité de poids ou de volume de préparation coagulante en 40 min et à 35 C° (**Alais, 1984**).



DEUXIEME PARTIE
ETUDE
EXPERIMENTALE





**Matériel
Et
Méthodes**

1. Objectif de l'étude

L'objectif de ce travail est d'étudier la possibilité de substituer la présure par la ficine extraite du latex de figuier comme agent coagulant du lait.

Pour atteindre cet objectif, nous avons procédé à comparer l'effet de la ficine à celui de la présure, nous avons approché la cinétique de la protéolyse.

2. Lieu et durée du travail

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de recherche des Sciences et Techniques de Production Animales de Hassi-Mamèche, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de l'Université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem.

Période expérimentale: du mois d'**Avril 2023** au **Mai 2023**.



Figure 08: Situation géographique de laboratoire de recherche LSTPA de l'université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem (Google maps).

3. Produits utilisés

Les échantillons de la ficine

Les échantillons de latex de figuier provenaient de la ferme expérimentale de l'Université de Mostaganem à Mazagran.

La présure commerciale

Les échantillons de présure commerciale provenaient de la ferme expérimentale de l'Université de Mostaganem à Mazagran.

Le lait

Le lait expérimental a été reconstitué à raison de 12% (p/v) à partir d'une poudre de lait écrémé moyenne chaleur enrichi en protéines récupérée de la filiale GIPLAIT « Laiterie de Tlemcen ».

Pour amender l'équilibre minéral, le lait a été enrichi avec du phosphate monocalcique (0,01M) et stabilisé avec de l'azide de sodium (0,025%) pour éviter tout développement microbien. IL est ensuite stocké au réfrigérateur pendant 10 à 15 heures pour une bonne réhydratation des protéines et permettre l'équilibre physico-chimique.

La poudre de lait utilisée a été récupérée de la filiale GIPLAIT, Laiterie de Tlemcen, du même lot, de marque Spoldzielnia Mleczarska MLEKOVITAPOLOGNE, conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité.



Figure09 : Lait reconstitué.

4. Techniques d'analyse

Caractérisation du lait reconstitué

Analyses physico-chimiques du lait

On a utilisé le LACTOSCAN pour mesurer quelque paramètre physicochimique du lait (sauf L'acidité) :

F : matière grasse

D : densité

C : taux de cendre

S : matière sèche

P : protéine

T : température

PH : potentiel hydrogène

FP : point de congélation

S' : taux de salinité

W : activité de l'eau

L : lactose



Figure10 : Lactoscan.

Détermination de l'acidité titrable

La mesure de l'acidité titrable est établie selon la norme F.I.L ISO 707.

Définition

La caséine, les minéraux et les acides organiques, les interactions avec les phosphates secondaires, l'acide lactique et d'autres acides organiques produits par l'activité microbienne font partie des composants du lait qui contribuent à son acidité (Bourahla, 2020).

Elle est déterminée par titrage de l'acide lactique.

Principe

Le titrage avec une solution alcaline et de la phénolphthaléine est utilisé pour mesurer l'acidité du lait.

Réactifs

Hydroxyde de sodium, solution titrée à 0,1 mol/l.

Phénolphthaléine, solution alcoolique à 1 g pour 100 ml.

Mode opératoire

Introduction de 10 ml du lait reconstitué dans un bécher, ajout de 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine 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

Pour exprimer les résultats, il faut tenir compte du fait que 1 millilitre de la solution titrée équivaut à 0,01 gramme d'acide lactique. La formule fournit l'acidité titrable en grammes d'acide lactique pour 100 g de matière :

$$0,01 \text{ g} \times V \times 100/2 = V/2$$

Où

V: représente le volume en millilitres de solution sodique à 0,111 ml/l utilisé pour le titrage.

Pour une fiabilité de l'analyse on doit prendre la moyenne de deux déterminations.

Ce résultat est traduit en degré Dornic (°D) : 1°D = 0,1 grammes d'acide lactique dans 100gde poudre de lait.



Figure 11 : Mesure de l'acidité Dornic.

Caractérisation de l'extrait enzymatique

Les laits fromagers

Dans cet essai notre but est d'étudier les aptitudes à la coagulation du lait par des enzymes extraites de figuier (la ficine) en le comparant avec la présure commerciale.

On a établi la démarche suivante

- On a réparti le lait dans 8 flacons transparents, chaque flacon contient 100 ml du lait, il a été réalisé des essais de différentes doses (de 0,75ml, de 1ml, de 1,25 ml et de 1.5 ml) d'enzyme coagulante ficine et de la présure commerciale.
- Les enzymes coagulantes ont été ajoutées au lait à 35°C. Comme indiqué dans la (Figure 12)

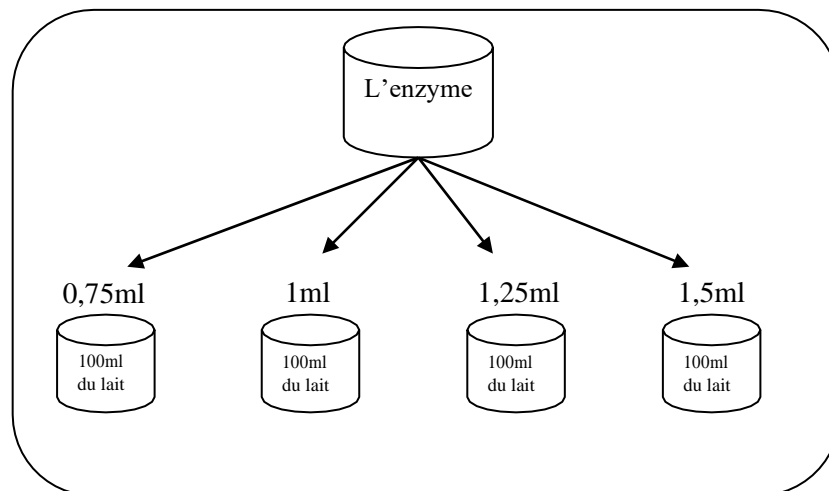


Figure 12: Répartition du lait et ajout des différentes doses des extraits d'enzymes.

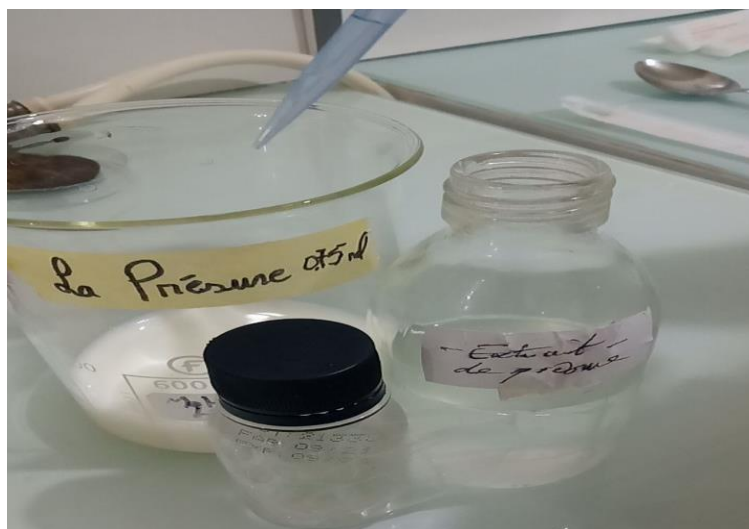


Figure 13 : Méthodologie de l'ajout des enzymes au lait.

- Cette démarche a été établie pour l'ensemble des enzymes et dans les mêmes conditions.
- Un chronomètre a été utilisé pour mesurer les temps technologiques de coagulation.
 - **Remarque :** la même chose pour les deux enzymes.

Détermination des temps de coagulation

L'activité coagulante est déterminée par la mesure du temps de floculation et du temps de prise selon la méthode d'**Alais, (1974)** et actualisée par (**Tanaka et al, 2001**).

Détermination du temps de floculation

Le temps de floculation est l'intervalle de temps compris entre le moment de l'emprésurage et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu (figure 14).



Figure 14 : Aspect de la détermination du temps de floculation.

Détermination du temps de prise

Le temps de prise est le moment où apparaissent les premières gouttelettes de lactosérum (début de l'exsudation du lactosérum) sur la surface du gel appelé aussi coagulum qui devient rigide et ne coule plus sur les parois du tube. Ce temps de prise en masse compacte est noté. Pour toute coagulation, le temps de prise représente généralement environ le double du temps de floculation : ainsi pour un temps de floculation compris entre 8 et 15 minutes, le temps de prise se situe entre 16 et 30 minutes (FAO /OMS ,1999).



Figure 15 : Aspect de la détermination du temps de prise.

Activité coagulante

L'unité d'activité coagulante U.A.C ou l'unité présure est défini par la quantité d'enzyme contenu dans 1 ml qui peut coaguler 10 ml de lait (substrat standard d'**Alais (1974)**): 12% p/vde lait écrémé en poudre dissout dans une solution de CaCl₂ 0,01 M en 100 secondes à 30°C.

$$\text{U.A.C} = 10. V / T.V'$$

Où :

V : volume du lait

V' : Volume de l'extrait enzymatique

T : temps de floculation

Un volume de 10 ml de lait est versé dans un tube à essai et porté à 30°C dans un bain marie.

Au temps zéro, 1 ml de la solution enzymatique est ajouté et le chronomètre déclenché. Le tube immergé est maintenu incliné, de telle sorte que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du lait .IL est régulièrement animé d'un mouvement rotatif autour de son axe. Le lait forme ainsi un film mince et homogène. Au moment de la floculation des petits flocons apparaissent au sein même de ce film. Le chronomètre est arrêté à ce moment et le temps de floculation est ainsi noté.

Force coagulante

L'activité coagulante peut être également exprimée en force coagulante de Soxhlet. Cette force coagulante définit le volume du 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) (**Benyahia, 2013**).

La force coagulante est exprimée par la formule suivante :

$$F = \frac{2400 \cdot V}{T \cdot V'}$$

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 floculation du lait (en secondes) ;

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

Mesure du pH des extraits enzymatiques

Le pH représente l'acidité des extraits enzymatiques à un moment donné et nous renseigne sur l'état de l'efficacité des enzymes, c'est une mesure de l'activité des ions H⁺ 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 des béchers contenant les extraits enzymatiques.



Figure 16 : pH-mètre.

Détermination de l'extrait sec

La détermination de l'extrait sec total du lait est établie selon la norme F.I.L ISO 707. L'extrait sec total correspond au poids du résidu restant après dessiccation de l'échantillon à 105°C dans dessiccateur infra-rouge (KERN MLS 50-3C). Le principe consiste à sécher 5g de caille du lait par infrarouge et à contrôler en continu le poids à l'aide d'une balance de précision intégrée jusqu'à poids constant. Le pourcentage d'extrait sec total est calculé par la différence entre le poids initial et le poids final après évaporation complète de l'eau contenue dans l'échantillon analysé.



Figure 17 : Dessiccateur.

Cinétique de la protéolyse

Détermination de la teneur en azote total (protéines) et de l'azote non protéique NPN

La détermination de la teneur en azote total est effectuée par la méthode de Kjeldahl et selon la norme FIL ISO 707. Elle consiste en une minéralisation de l'échantillon du lait reconstitué par chauffage en présence d'un mélange d'acide sulfurique concentré, de sulfate de potassium et de sulfate de cuivre, utilisés comme catalyseurs pour convertir l'azote organique de l'échantillon en sulfate d'ammonium.

Le produit de la réaction est additionné de la soude pour libérer de l'ammoniac qui sera titré par une solution d'acide chlorhydrique en présence d'acide borique.

Minéralisation

Une prise d'essai de 10 g de chaque échantillon du caillé du lait expérimental est pesée dans un tube en verre appelé matras, ensuite, 0,5 g de sulfate de potassium (K_2SO_4), 0,5 g de

sulfate de cuivre (CuSO_4) et 15 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4 , 0,2 N) ont ajoutés à l'échantillon, ensuite le matras est placé dans l'appareil de Kjeldahl à une température de 400°C pendant 1h30 min.

Distillation et dosage de l'azote total

L'échantillon minéralisé est refroidi à température ambiante, puis son contenu est dilué avec 75 ml d'eau distillée qui servent en même temps à rincer les parois du matras. Ensuite, cederier est raccordé à l'appareil de distillation où 60 ml (3x20ml) de l'hydroxyde de sodium à 30% sont ajoutés à l'échantillon. L'ammoniac produit (suite à l'ajout de la solution de NaOH), est capté avec 25 ml d'acide borique (H_3BO_3) qui vire du rose au vert. L'ammoniaque contenu dans la solution d'acide borique est titrée avec une solution d'acide sulfurique à 0,1N jusqu'à obtention de la couleur de départ de l'acide borique (rose).

L'azote total de l'échantillon est obtenu par la formule

$$\text{Azote total en \%} = \frac{(\text{Cb} - 0,1) \times \text{N} \times 14}{\text{Pe}} \times \frac{10}{1000}$$

Cb : Chute de la burette (ml).

N : Normalité de l'acide sulfurique (solution de titration).

14 : Masse équivalente de l'azote.

Pe: Masse de la prise d'essai (g).

La quantité des protéines totales est obtenue par la formule suivante :

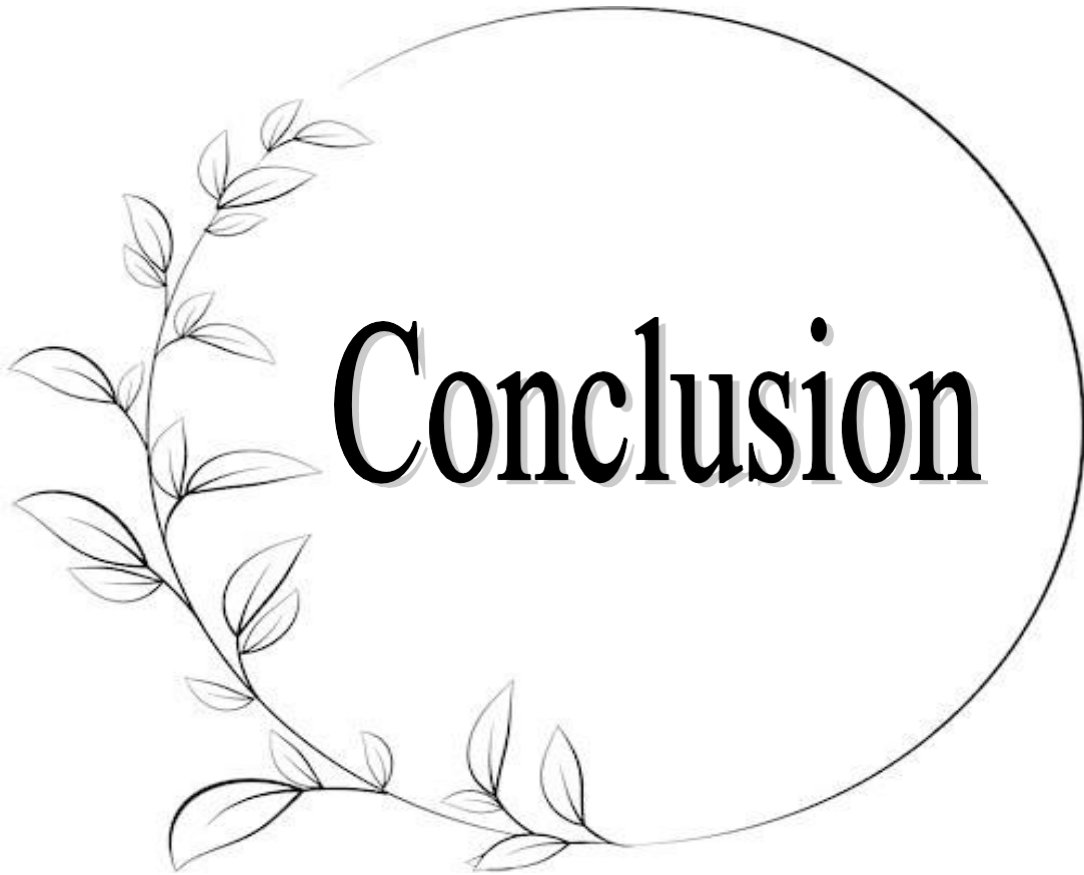
$$\text{Azote totale en \%} \times \text{F}$$

F : facteur de conversion de l'azote en protéines = 6,38

Le taux d'azote non protéique (NPN) est déterminé après précipitation des protéines du lait avec une solution d'acide trichloracétique (T.C.A) à une concentration finale de 12% suivi d'une filtration.



Figure 18 : Filtration du caillé obtenu.

A decorative graphic featuring a thin black line forming a circle. On the left side, a leafy branch with several small, pointed leaves curves upwards and then downwards, partially overlapping the circle. The word "Conclusion" is written in a bold, black, serif font across the center of the circle.

Conclusion

Notre étude est portée sur la contribution à la recherche des succédanés de présure utilisables industriellement. Nous avons étudié la possibilité de substituer la présure par la Ficine (d'origine végétale) et de tester la répétition dans le temps des tests d'aptitude fromagère en utilisant pour la coagulation un lait reconstitué de qualité fromagère contrôlée.

Notre stratégie comprenait deux étapes pour atteindre l'objectif de l'étude. Tout d'abord, la régulation des propriétés physico-chimiques du lait de fromagerie reconstitué Afin d'évaluer la viabilité de l'utilisation d'extraits enzymatiques d'origine animale et végétale comme substitut de la présure commerciale, des caillés de fromagerie ont été fabriqués en utilisant ces extraits comme coagulants

L'ensemble des résultats auxquels a abouti notre étude constitue une première évaluation de la caractérisation des étapes de la coagulation lors de la substitution de la présure par des enzymes extraites d'origine végétale.

L'activité coagulante sur le lait reconstitué d'enzyme extraite en comparaison avec la présure commerciale a montré quelques différences. En effet, unité d'activité coagulante de de l'extrait de figuier 1,33 U.A.C pour un temps de floculation de 12,30min, de l'extrait. Cette appréciation a été faite en comparaison avec la présure commerciale qui donne 2,22U.A.C pour un temps de floculation 7,30min. Nous avons remarqué que le lait reconstitué se coagule rapidement avec la présure commerciale Mais cela ne signifie pas qu'il y a un défaut dans le remplacement la présure commercial avec l'extrait de figuier (Ficine) au contraire nous avons observé des capacités bénéfiques de coagulation qui seront adaptées avec la maîtrise des temps technologiques.

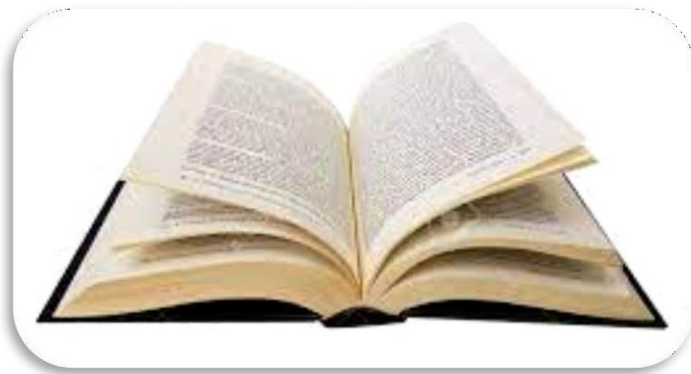
En résumé, on peut dire que les résultats semblent intéressants, notamment au vu de la possibilité de produire des extraits enzymatiques qui pourraient remplacer la présure commerciale dans l'industrie fromagère en passant ces essais expérimentaux à l'échelle industrielle. D'autant plus que ces extraits enzymatiques ont été fabriqués à partir de matières premières inexplorées et facilement disponibles dans la région.

En perspectives, il serait intéressant d'apporter à ce présent travail d'autres recherches plus complémentaires, notamment par:

- La détermination du type de fromage à adapter pour cette enzyme.

- L'utilisation des enzymes extraites soit d'origine animale ou végétale à grande échelle en technologie fromagère et mener une étude comparative sur la qualité des produits finis
- L'établissement d'une étude de faisabilité technico-économique de l'extraction de ces enzymes coagulantes à valoriser en fromagerie

Références Bibliographiques



Références bibliographiques

A

Abdellaoui R. (2007) : Obtention et caractérisation d'une enzyme coagulant le lait d'*Aspergillus niger* isolé sur Sole de la région de Boumerdes. Mémoire de Magister, Université M'hamed Bougara, Boumerdes. 3-7 p.

Adoui F. (2007) : Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir de proventricules de poulet. Mémoire de Magister. Université Mentouri, Constantine. 10-15-64 p.

Alais C (1974), Science du lait principes des techniques laitières. 3^{ème} édition 807P.

Alais. C. (1984). Sciences du lait, principes des techniques laitières, volume 11, 4^{ème} édition, Paris: SEPAIC, 814p.

Alais. C. (1984). Sciences du lait, principes des techniques laitières, volume 10, 3^{ème} édition,

Alais.C. (1984). Science du lait .Edition Sepaic. Paris .814P

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

Arab S, Idres L.2021. Synthèse bibliographique sur Les enzymes coagulantes. Mémoire de Master. Université TIZI-OUZOU.58p.

B

Benyahia F. (2013) : Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vue d'une valorisation des proventricules de volailles au profit de la filière lait en Algérie. Thèse de Doctorat, Université Constantine 1. 13-10 p.

Boughellout H. (2007) : Coagulation du lait par la pepsine de poulet. Mémoire de Magister, Université Mentouri, Constantine. 13 p.

Bourahla H (2020). Effet de la substitution de la présure par la pepsine de poulet dans la coagulation des laits destinés à la transformation fromagère. Mémoire de Master. Université Mostaganem.75p.

C

Cuvellier G.F. (1993) : Production des enzymes in Biotechnologie. Coord Scriban R. 4^{ème} édition Tec&Doc, Lavoisier. 948 p.

E

Eck A et Gillis J.C. 2006. Le fromage. 3eme édition : Tec et Doc, Lavoisier. Paris. 891p.

F

F.I.L ; la référence ISO 707/ F.I.L octobre 2018 (Normes définies pour les analyses microbiologiques et chimique des laits, produits laitiers et des laits en poudre.

Fox P.F., Singh T.K. et Mc Sweenely P.L.H. (1994): Proteolysis in cheese during ripening. 1-32 p.

J

Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P. et Brule G(2008). Les produits laitiers. Ed. Tec& Doc, Lavoisier, 39-40 p.

K

Kellil S. (2015) : Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie. Thèse de Doctorat, Université M'hamed Bougara, Boumerdes. 24 p.

L

Lij D et Daligleish G. (2006): Mixed coagulation of milk – gel formation and mechanism, J. Agric. Food Chem. 54, 4687–4695.

Lucey J.A. (2002): Formation and physical properties of milk protein gels. J. Dairy Sci. 8: 281-294.

Luquet M. (1985): Lait ET produits laitiers. Vache, brebis, chevre. 1. Les laits. De la mamelle a la laiterie. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 884p.

M

Mahaut M., Jeantet R. Et Brulé. G (2000). Initiation à la technologie fromagère. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris 194 p.

P

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

R

Roset G. (2019). Coagulation et coagulation enzymatique en transformation fromagère. Technique de l'ingénieur, 2, F4700.

S

Schmidt L. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. In: Developments of dairy chemistry 1-proteins. Applied science publishers. 61-86 p.

Siar H (2014). Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait. Mémoire de Magister, Université Constantine 1. 17-32 p.

T

Tanaka T. et Yada R (2001). N terminal portions acts as an initiation of the inactivation of pepsin at neutral Ph .Protein Engineering ,14(9) :669-674.

Teuber M. (1990). Production of chymosin by microorganisms and its use for cheesemaking. Bull.IDF, 251,3-15.

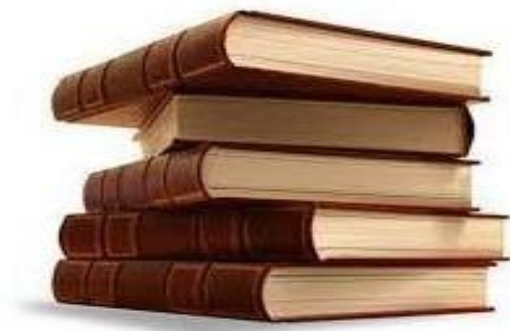
V

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

Site web

- [1]. [https://www.youlab.fr/blog/ressources-scientifiques-bibliographie/le-lait-et-sa coagulation/](https://www.youlab.fr/blog/ressources-scientifiques-bibliographie/le-lait-et-sa-coagulation/)
(Consulter le 05.02.2017 à 23.00 h).
- [2]. [http://www.memoireonline.com/04/10/3418/m_lait-et-fromage-au Benin3.html](http://www.memoireonline.com/04/10/3418/m_lait-et-fromage-au-Benin3.html)
(Consulter le 25.02.2017 à 22.00 h).

Annexes



Annexe A : Produits et matériels utilisés

1. produit

- Eau distillée.

1.1 Réactifs chimiques

- Tampons de pH (4,00 et 7,00).
- Hydroxyde de sodium NaOH (0,1N et 3N).
- Phénolphtaléine.
- l'azide de sodium.

2. Matériels

Verreries

- Ballon à fond plat.
- Béchers (10ml- 100ml- 1000ml).
- Pipettes graduées (10ml).
- Micropipette.
- Cônes bleue.
- Burette graduée (25ml).
- Eprouvettes graduées (100 ml, 250ml 500ml).

Appareillages

- Agitateur magnétique.
- PH-mètre.
- Thermomètre.
- Bain marie (memmert).
- Réfrigérateur (kühlbox 2000).
- Balance électrique (KERN).
- Lactoscan (ultrasonic milk analyzer).
- Dessiccateur (///ACIS).
- Etuve (30°C et 35°C) (memmert).

Autres matériels

- Bec Bunsen.
- Papier filtre.
- Papier aluminium.

- Barreau magnétique.
- Propipette.

Annexe B : L'extraction de la ficine

Est faite selon les étapes suivantes

Collecte des feuilles

- Séchage de feuille de figuier (10g) les deux variétés.
- Broyage légère a main dans l'azote liquide.
- La pesé de la masse dans un tampon (la masse x10).
- Agitation léger.
- L'ajout de triton X (1%).
- Agitation léger.
- Macération pendant 24h.
- Filtration a gaze.
- Centrifugation 5000 tours / min pendant 10 minutes.
- Récupération du surnagent.

Merci

