الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة امحمد بوقرة-بومرداس
UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES
Faculté des Sciences Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master académique

Filière *Sciences Biologiques*

Spécialité *Biochimie appliquée*

THÈME

Étude comparative des coagulations du lait par action de la ficine de *Ficus carica*L. et des enzymes coagulants bien connues

Présenté par : - Mr Bensaadi Hocine - Mr Boucif Walid

Soutenu le : 07 /07/2022

Devant le jury composé de :

Mr Boudjema K.	**Maître de Conférences A (UMBB)**	**Président**
Mme Akmoussi-toumi S.	**Maître de Conférences B (UMBB)**	**Promotrice**
Mme Khemili-Talbi S.	**Professeur (UMBB)**	**Examinatrice**

Année Universitaire 2021/2022

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu, le Tout Puissant, le Miséricordieux, pour nous avoir donné la force, le courage et surtout la patience d'accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à notre projet de fin d'études. Nous tenons d'abord à remercier notre promotrice, Mme AKMOUSSI Sihem, qui a été avec nous et qui nous guide depuis le début, pour sa disponibilité, sa confiance et les conseils qu'elle nous a généreusement prodigués,nous nous sommes très reconnaissant.

Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect au jury pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce mémoire :

Mr BOUDJEMA Khaled en tant que président du jury et Mme KHEMILI Souad en tant qu'examinatrice.

Nous tenons à remercier également le personnel du laboratoire pédagogique de biochimie appliquée de l'université M'hamed Bougara de Boumerdes pour leurs aides, leurs conseils ainsi qu'à tous nos professeurs qui nous ont accompagnés durant tout notre cursus universitaire.

Nous remercions toutes les personnes du laboratoire de la Laiterie Fromagerie de Boudouaou (LFB), et plus particulièrement Mme CHAHEDFarida pour son accueil chaleureux au sein de laboratoire, ainsi que pour sa patience et ses précieux conseils.

Un grand et infini merci également à nos parents pour leur soutien à toute épreuve, aussi bien moral que financier ainsi que pour tous leurs sacrifices.

Dédicace

Au nom de Dieu le clément et le miséricordieux. Louange à

Dieu qui m'a aidé durant des années, éclairé et ouvert les portes du savoir.

C'est avec une joie immense et le cœur ému que je dédie ce mémoire à mes chers parents, quoi que je dise ou que je fasse, je n'arrivai jamais à vous remercier comme il se doit. C'est grâce à vos encouragements, vos bienveillances et votre présence à mes côtés, que j'ai réussi ce respectueux parcours.

Je souhaite que vous soyez fière de moi, et que j'ai pu répondre aux espoirs que vous avez fondés en moi.

À mes chers frères HAROUN et AKREM

Merci pour vos soutiens moral, vos confiances et vos conseils précieux, qui m'ont aidé dans les moments difficiles.Je vous souhaite le bonheur et la réussite dans vos vies.

A toute ma famille et mes amis

À travers ses lignes je ne peux pas vous décrire tous mes sentiments d'amour, le seul mot que je peux dire est merci, vraiment merci beaucoup à toute personne qui a contribué à la réalisation de ce mémoire.

Hocine

Dédicace

Au nom de Dieu le clément et le miséricordieux. Louange à

Dieu qui m'a aidé durant des années, éclairé et ouvert lesportes du savoir.

C'est avec une profonde émotion que je dédie ce mémoire :

À mes chers parents à qui je dois tant et qui n'ont pas cessé de me témoigner affection, pour leur amour, soutient, et leurencouragement, en espérant les rendre fières.

À mes chers frères RAHIM et AMINE.

À ma sœur unique ASMA.

À mon binôme HOCINE.

À mes amis MOHAMMED, ABDENASSER etABDERRAHMANE.

Enfin je dédie à tous ceux que je connais de près ou de loin.

WALID

Sommaire

Table de matière

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction ……...1

Chapitre I:Synthèse bibliographique

I.1 Les enzymes coagulantes des industries laitières 2
I.1.1 Enzymes coagulantes d'origine animale 2
I.1.1.1 La présure 2
I.1.2 Les succédanés de la présure 2
I.1.2.1. Les succédanés de présure d'origine animale 3
I.1.2.2. Les succédanés de présure d'origine microbienne 4
I.1.2.3 Les succédanés de présure d'origine végétale 6
I.2. Figuier 7
I.2.1. Origine et répartition 7
I.2.2.Classification et description : 7
I.2.3 Latex 9
I.2.3.1 Ficine ..... **Erreur ! Signet non défini.**
I.3. Coagulation du lait 11
I.3.1 Coagulation enzymatique du lait 11
I.3.1.1 Mécanisme de la coagulation enzymatique du lait 12

Chapitre II : Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes 16
II. 1. Présentation de l'unité LFB 16
II.2. Matériel 16
II.2.1. Matériel biologique 16
II.2.2. Matériel non biologique 18
II.3. Méthodes 18
II.3.1. Caractérisation physico-chimique de l'extrait brut de la Ficine, présure et du coagulant microbien 18
II.3.1.1. Mesure du pH 18
II.3.1.2. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques 18
II.3.1. 3. Mesure de l'activité enzymatique 18
II.3.2. Détermination des conditions optimales d'activité coagulante 20

II.3.2.1. Effet de la température sur l'activité coagulante 20
II.3.2.2. Effet du pH sur l'activité coagulante 21
II.3.2.3. Effet de la concentration de $CaCl_2$ sur l'activité coagulante : 21
III.Caractérisation de la poudre de lait 21
III.1. Analyses physico-chimiques de la poudre de lait 22
III.1.1 Détermination du taux d'humidité 22
III.1.2 Détermination de l'acidité (Dornic) 22
III.1.3 Détermination de la teneur en matière graisse (MG) 23
III.1.4 Mesure du potentiel d'hydrogène (pH) 23
III.2 Analyse microbiologique de la poudre du lait 23
III.2.1 Préparation de la solution mère et des dilutions 24
III.2.2 Recherche et dénombrement de la flore totale aérobie mésophile 24
III.2.3. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux 24
III.2.4. Recherche et dénombrement de Clostridium sulfito-réducteurs 25
III.2.5. Recherche des Salmonelles 25
III.2.6. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus* 25

Chapitre III : Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion 28
III.1 Caractéristiques physico-chimiques des extraits enzymatiques 28
III.1.2 Dosage des protéines des extraits enzymatiques 29
III.1.3 Activité coagulante 30
III.1.4 Activité protéolytique 30
III.2 Conditions optimales de l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudieś 32
III.2.1 Effet de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques 32
III.2.2 Effet du pH du lait sur l'activité coagulante 34
III.2.3 Effet de la concentration en $CaCl_2$ 36
III.3. Caractérisation physico-chimique et microbiologique de la poudre de lait 38
III.3.1. Analyses physico-chimiques de la poudre de lait 38
III.3.2. Analyses microbiologiques de la poudre de lait 38
Conclusion generale et prespectives 38
Bibliographiques 41
Annexes 53

Listes des figures

Figure1 : Hydrolyse de la caséine κ par la présure (Fox et al., 1994). 13
Figure 2: Photographie des différentes phases constituant le latex 17
Figure 3 : Activité protéolytique exprimée par le taux de tyrosine libéré pour l'extrait brut de la ficine, la présure animale et du coagulant microbien..... 31
Figure 4 : Effet de température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine 33
Figure 5 : Activité coagulante relative des extraits coagulants en fonction de la température du lait. 33
Figure 6 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine. 34
Figure 7 : Activité coagulante relative des extraits coagulants en fonction du Ph du lait. 35
Figure 8 : Effet de la concentration en CaCl2 sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine. 36
Figure 9 : Activité coagulante relative des extraits coagulants en fonction de concentration en CaCl2 du lait. 37

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques de l'extrait enzymatique brut de la ficine, présure animale et le coagulant microbien. 28
Tableau 2 : Résultats des analyses microbiologiques de la poudre de lait 38
Tableau 3 : Résultats des analyses microbiologiques de la poudre de lait 39

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

B.S.A : sérum albumine bovine.

Da : Dalton

Dornic (°D) : décigramme d'acide lactique par litre.

F : Force coagulante.

FIL : la fédération internationale du lait

H (%) : Humidité.

ISO : Organisation internationale de normalisation.

LFB : Laiterie Fromagerie de Boudouaou

MS : matière sèche.

O.N.S : l'Office National des Statistiques

PCK : la Para-Caséine-Kappa.

pH : potentiel hydrogène.

SM : Solution mère.

U.A.C. : Unité d'Activité Coagulante

U P : Unité présure

Introduction

Les protéases sont un groupe d'enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques des protéines, provoquant la libération de polypeptides ou d'acides aminés libres. Actuellement, les protéases représentent près de 60 % des enzymes industrielles commercialisées dans le monde en raison de leurs caractéristiques intéressantes de spécificité et de stabilité lors de leur utilisation dans divers procédés biotechnologiques **(Jisha et *al*., 2013).**

L'Algérie connaît un développement notable du secteur laitier où la consommation du lait et des produits laitiers a augmenté de 2,7 millions de tonnes en 1990 à 3,4 millions de tonnes en 2004 (FAO). Selon l'Office National des Statistiques (O.N.S.), près de 25 mille tonnes de fromages ont été vendu dans le marché Algérien. Soit une consommation de l'ordre de 0,62 Kg/habitant. Et les fromageries Algériennes ont utilisé 1,5 tonne de présure et/ou ses succédanés ; cette quantité totalement importée a coûté une valeur de plus de 102 mille dollars l'équivalent d'environ 7,5 millions de DA **(Zikiou, 2013).**

Bien que la présure soit encore l'enzyme coagulante la plus utilisée en fromagerie, sa production connaît une pénurie mondiale croissante. Cette pénurie est essentiellement due à une augmentation croissante de la production et de la consommation du fromage, et l'impossibilité d'augmenter en parallèle la production de présure. Cette pénurie a provoqué des fluctuations très importantes de son prix. Ces problèmes sont aggravés, dans les pays musulmans, par des raisons religieuses, dues aux rituelles de l'abattage, et l'interdiction de certains agents coagulants tels que la pepsine porcine. Ces raisons ont fait que de nombreuses recherches ont été entreprises afin de trouver des succédanés efficaces et compétitifs utilisables industriellement. Pour cela, le choix d'un succédané de présure de production locale, est préférable. Il demande un approvisionnement permanent limitant la dépendance avec l'importation et les fluctuations de prix et répond mieux à nos exigences religieuses **(Shah and Mir, 2018 ; González-Velázquez et *al*., 2021).**

Les substituts de présure produits par des micro-organismes et des micro-organismes génétiquement modifiés se sont avérés être des substituts appropriés pour la présure animale, mais un intérêt croissant a été dirigé vers les coagulants végétaux, c'est-à-dire les enzymes de coagulation du lait extraites des plantes. **(Shah et *al*., 2014).**

Parmi les protéases d'origine végétale actuellement utilisés pour la coagulation du lait, se distinguent ceux obtenus à partir du figuier *Ficus carica,* une ressource naturelle utilisée

depuis longtemps dans les régions d'Algérie, particulièrement la Kabylie, pour la production de fromages artisanaux, avec des caractéristiques uniques et distinctives, notamment la saveur, la texture et l'arôme, connu sous le nom « Agougli » **(Mazri *et al.*, 2018)**.

Notre travail a pour objectif la possibilité de substituer les extraits enzymatiques obtenus à partir de figuier à la présure commerciale, et leur efficacité coagulante sur le lait reconstitué. Ce travail est divisé en deux parties : la première partie comporte une synthèse bibliographique et la deuxième une partie pratique.

La première partie qui résume l'étude du figuier et les enzymes coagulantes des industries laitières.

Une deuxième partie exposant le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de ce travail. Enfin les résultats obtenus sont discutés et interprétés. L'étude est finalisée par une conclusion générale est des perspectives pour compléter la présente étude.

Synthèse bibliographique

I.1 Les enzymes coagulantes des industries laitières

Les enzymes coagulantes sont des enzymes protéolytiques retrouvées chez tous les organismes vivants, elles sont soit d'origine animale (présure, pepsine) ; soit d'origine végétale (ficine, bromélaine, enzymes extraites de l'artichaut, de la courage, du chardon, etc.); soit d'origine microbienne (enzyme de certaines moisissures ou des bactéries) (Mahaut et *al*., 2000)

I.1.1 Enzymes coagulantes d'origine animale

I.1.1.1 La présure

Historique de la présure

Selon les historiens, il y a environ 7000 ans, le lait était transporté dans des sacs. Ces sacs, appelés outres, étaient faits avec l'estomac de certains animaux. Or, un voyageur de cette époque qui décida de se rafraîchir avec le lait qu'il transportait, eut la surprise de découvrir que le lait s'était transformé en une substance semi solide. Intrigué et affamé, il goûta le contenu de son outre et ne trouva pas ça mauvais du tout, il venait de découvrir le fromage Ainsi, nous savons depuis ce temps-là qu'une substance contenue dans l'estomac des jeunes ruminants fait cailler le lait. En fait, cette substance s'appelle la présure.

Définition de la présure

Selon la fédération internationale du lait (FIL) la dénomination « présure » est donnée l'extrait coagulant provenant des caillettes de jeunes ruminants abattus avant sevrage (Andren et *al*., 2002). Elle est constituée de deux fractions actives, l'une majeure, constituée par la chymosine (E.C.3.4.23.4), l'autre mineure, par la pepsine (E.C.3.4.23.1,2,3) (Abbas, 2012).

I.1.2 Les succédanés de la présure

La présure traditionnelle telle que la chymosine est très utilisé dans les industries fromagères. La forte demande subite l'approvisionnement de la présure est plus difficile. Des travaux ont été lancé afin de trouver d'autre sources potentielle de protéase pour remplacer la présure nommées des succédané de présure (Nouani et *al.*, 2009).

Les enzymes coagulantes appelées aussi les succédanés de présure, ils sont classées on 3 catégories selon l'origine de l'enzyme :

- ★ Succédanés de présure d'origine animale.
- ★ Succédanés de présure d'origine végétale.
- ★ Succédanés de présure d'origine microbienne.

D'après (Ramet 1990 et Smeets 1995), toute enzyme de remplacement de la présure doit présenter certaines propriétés physico-chimiques pour être utilisée à l'échelle industrielle, donc tout succédané de présure doit répondre aux critères suivants :

- ✓ La production de fromage doit être très proche ou supérieure à celle obtenue avec la présure.
- ✓ Une bonne solubilité dans l'eau, qui va conditionner la répartition du produit et permettre l'obtention d'un coagulum homogène.
- ✓ Une activité protéolytique et lipolytique faible.
- ✓ Une absence de toxicité et un degré de pureté élevé.
- ✓ La synérèse du coagulum au cours de l'égouttage et les modalités d'affinage devaient permettre d'obtenir les caractéristiques usuelles des fromages dans un délai sensiblement égal à celui de la présure.
- ✓ Les propriétés rhéologiques du coagulum doivent évoluer après floculation de manière d'assurer le travail mécanique du gel dans les délais habituels.

I.1.2.1. Les succédanés de présure d'origine animale

Pepsine bovine

Nommée aussi la pepsine A, elle provient de l'estomac d'animaux adultes, sa masse moléculaire est de 33370 Da et contient 313 acides aminés (Fox, 1969 ;Graindy, 1978 ; Mathieu, 1981). La pepsine bovine a une activité protéolytique proche de celle de la chymosine, cette activité dépond du pH du milieu, elle est généralement active dans des milieux acides ou le pH est de 1.5 à 2 (Goursaud, 1992). En revanche, dans les milieux basiques, un pH supérieur à 6,3, l'activité diminue rapidement et le lait ne coagule pas. (Eck et

Gillis, 1997). La pepsine bovine est destinée à la fabrication du Cheddar (Shamsuzzuman et *al.*, 1985 ; Cuvellier, 1999). D'après Bengana, (2001), la substitution de présure à la pepsine bovine permet la fabrication de fromage à pâte molle type Camembert.

Pepsine de poulet

Nommée aussi pepsine C, elle est extraite du pro ventricule ou ventricule succenturié qui est un renflement fusiforme de 3 cm de long en moyenne, situé au-dessus du gésier, il est revêtu d'un épithélium de cellules cylindriques Elle, est composée de 308 résidus d'acides aminés et un poids moléculaire de 35000 Da (Bohak, 1969). Le pH optimum de la pepsine de poulet est de 2,8. L'enzyme reste stable à pH 8, et devient inactive à pH 8,5 (Bohak, 1969). La pepsine du poulet a une forte activité vis-à-vis l'hémoglobine (Linden et Humbert, 1991). Elle est utilisé pour la fabrication du fromage à pâte molle, peu de différences d'arôme, de goût ou de consistance ont été remarquées par rapport aux mêmes types de fromage témoin préparé avec la présure.

I.1.2.2. Les succédanés de présure 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.

Parmi les voies de substitution de la présure, la production d'enzymes coagulant le lait partir de la culture microbienne, suscite un intérêt pour la fromagerie locale et dans le monde où plusieurs souches de micro-organismes font l'objet d'une fabrication industrielle de protéases coagulantes. De nombreux travaux ont été réalisés pour sélectionner des microorganismes capables de produire des enzymes coagulantes.Cet intérêt est motivé par plusieurs facteurs.: (Eck et Gillis, 1997).

La culture rapide peut accroître le rendement à travers l'amélioration génétique des souches, le contrôle et l'optimisation des conditions de fermentation.

- ✓ Les techniques de production sont relativement simples et les équipements sont utilisables à plusieurs fins; les prix de revient sont donc satisfaisants.
- ✓ Il est possible de produire des enzymes microbiennes en quantités illimitées sans dépendre de l'approvisionnement en matières premières.
- ✓ L'utilisation de préparations coagulantes d'origine microbienne est universelle, elle peut être considérée au niveau mondial sans contraintes géographiques,climatiques, philosophiques ou religieuse. (Tubesha and AL-Delaimy, 2003).

Bien que l'industrie fermentée nécessite des investissements lourds, de l'énergie et des conditions hygiéniques strictes, le développement de ce secteur ces dernières années ouvre de nouveaux horizons.

a. Les succédanés de présure d'origine bactérienne

Plusieurs espèces bactériennes ont été étudiées, particulièrement ceux qui appartiennent aux genre*Bacillus* et *Pseudomona*s tels que *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus coagulans*. Des essais assez poussés ont indiqué la présence d'une activité protéolytique trop élevée par comparaison à la présure dans les mêmes conditions de la coagulation du lait.

Selon Ramet (1997), un fromage cheddar préparé avec une protéase de *Bacillus subtilis* avait une saveur acceptable, mais le rendement est très faible suite à une protéolyse excessive.

Les enzymes provenant de souches bactériennes, principalement à partir de *Bacillus sp. Myxococcus sp*. (Poza et *al*.,2003) et *Nocardiopsis sp*. ont également été signalées (Cavalcanti et *al*.,2004).

Selon une étude réalisée par Zhao et *al.,*(2019) une espèce de *Bacillus amylolique faciens* GSBa-1 a été isolé à partir du levain traditionnel appelé jiuqu, qui contenait un mélange de levures, de moisissures et de bactéries. Le vin de riz fabriqué par fermentation de riz gluant avec du jiuqu était utilisé comme agent coagulant pour fabriquer le fromage royal traditionnel en chine. L'enzyme coagulante issue de *Bacillus amylolique faciens* GSBa-1 pourrait servir de nouveau coagulant du lait pour une application potentielle dans la fabrication de fromage avec la protéolyse souhaitée.

b. Succédanés d'origine fongique

Les coagulants microbiens sont produits par les organismes producteurs Rhizomucor ou Cryphonectria. La technologie de production d'enzymes avec des levures, des moisissures et des champignons comme principale source a été établie avec succès. Plus de la moitié des enzymes coagulantes du lait utilisées dans des régions comme le Royaume-Uni et les États-Unis sont d'origine microbienne, principalement à partir de levures et de moisissures alimentaires génétiquement modifiées (GM) contenant des copies du gène du veau pour la production de chymosine. L'autre type principal de coagulant microbien du lait est fabriqué à partir de moisissures non GM, Rhizomucor miehei (Law, 2010 ; Philipps-wiemann, 2018).

I.1.2.3 Les succédanés de présure d'origine végétale

Il existe dans divers pays tropicaux, certaines plantes susceptibles de fournir des enzymes ayant la propriété de coaguler le lait. Les protéases ont été identifiées et étudiées chez plusieurs familles végétales, particulièrement chez les Asteraceae, les Caricaceae, les Moraceae, Asclepiadaceae, Apocynaceae et EupHorbiaceae (Domsalla et Melzig, 2008).

Les protéases végétales les plus connues sont extraites du papayer (*Carica papaya*), figuier (*Ficus glabrata*), ananas (*Ananas comosus*), sarcocarpe de melon (*Cucumus melo*). Elles sont appliquées essentiellement dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (la papaïne, la ficine, la bromélaine et cucumisine). D'autres protéases extraites de chardons (*Cynara scolymus, Cynara cardunculus, Silybum marianum*) permettent la fabrication de fromages traditionnels, c'est le cas des cardosines et des cynarases (Benkahoul, 2016).
Par contre, l'utilisation de coagulants végétaux demeure limitée comparativement aux coagulants d'origine microbienne et animale.Elle se limite à certaines régions géographiques où l'on utilise des coagulants végétaux pour fabriquer des fromages traditionnels (Almeida & Simões, 2018).

Les études menées sur la plupart de ces extraits ont permis de classer les protéases selon leur mécanisme d'action. Cependant, plusieurs mécanismes d'action sont décrits pour les protéases végétales. Ce qui permet de les regrouper en fonction de la nature ou des acides aminés du site actif impliqués dans la catalyse. Six classes de protéases sont distinguées :

- Protéases à serine (EC 3.4.21)
- Protéases à thiol ou à cystéine (EC 3.4.22)
- Protéasesà acide aspartique (EC 3.4.23)
- Métalloprotéases (EC 3.4.24)
- Protéases à thréonine (EC 3.4.25)

La plupart des protéases végétales sont classées comme des protéases à serine ou des protéases à acide aspartique (Beka, 2011).

I.2. Figuier

I.2.1. Origine et répartition

L'arbre du figuier est nommé *Ficus carica L.*, c'est une des espèces qui signifie verrue pour *Ficus* (le lait pour soigner la verrue) et *carica* qui fait allusion à une région en Turquie.
Cette espèce a été cultivée par les Phéniciens, les Syriens, les Egyptiens et les Grecs dans tout le bassin méditerranéen. La plupart se trouvant dans les régions tropicales ou subtropicales et seulement une poignée avec des fruits considérés comme comestibles (Flaishman et *al.*, 2008). Il appartient à la famille des Moracées, qui comprend plus de 1400 espèces classées dans environ 40 genres (Mehraj et *al.*, 2013). La seule espèce cultivée pour ses fruits comestibles est *Ficus carica L*. (Michel, 2002).

I.2.2. Classification et description :

La classification botanique du figuier selon Gaussen et *al*., (1982) :

Règne :	Végétal
Embranchement :	Phanérogames
Classe :	Dicotylédones
Sous classe :	Hamamélidées
Série :	Apétales unisexuées
Ordre :	Urticale
Famille :	Moracée
Genre :	*Ficus*
Espèce :	*Ficus Carica .L*

Ficus carica L, ou figuier commun est un arbre fruitier de la famille des Moracées du genre *ficus* et dont le nom scientifique est :*Ficus carica L*, il est considéré comme l'emblème du bassin méditerranéen, où il est cultivé depuis des millénaires. Nos ancêtres ont utilisé les différentes parties de cet arbre, feuilles, latex, écorce et racines à des fins médicinales.

Le genre *Ficus* possède en moyenne 850 espèces, et le *Ficus* est probablement le leader de tous les genres de plantes vu le nombre d'espèces dont il dispose (Lansky et Helena, 2011). C'est un arbuste monoïque, de taille variable, à feuilles caduques ou grandes. Il atteint dix à douze mètres de haut avec une écorce grise et lisse. Ses feuilles parfumées sont de 12 à 25 centimètres de long et de 10 à 18 centimètres de diamètre et sont profondément lobées à trois ou cinq lobes, avec de nombreuses branches et troncs étalés rarement plus de 7 pieds de diamètre (Ahmad et *al.,* 2013).
Il se caractérise par un bon développement dans des zones à faible hygrométrie, fort ensoleillement et aux étés chauds et secs, ainsi que par son adaptation à une large gamme de sols (Oukabli, 2003). Les températures comprises entre 32 et 37°C sont très favorables au développement et à la maturité des fruits (Walali et *al.*, 2003).

Ficus carica L. (figue commune) est l'espèce de figuier ayant la plus grande valeur commerciale et comprend diverses variétés génétiquement diverses (Salhi-Hannachi et *al*., 2006;Barolo et *al.*, 2014). Parmi les autres espèces remarquables, citons *Ficus benghalensis L.* (le banian), *Ficus elastica Roxb*. ex Hornem. (l'arbre à caoutchouc indien), *Ficus racemosa L.* (syn. glomerata, l'arbre à grappes géantes) et *Ficus religiosa L.* (l'arbre Bo) (Lansky et al., 2008). Chez *Ficus carica*, le latex s'accumule dans des laticifères ramifiés non articulés (Marinho and Teixeira, 2019). À quelques exceptions près (*Hevea brasiliensis, Papaver somniferum* ou *Ficus elastica*), le latex est produit en très petites quantités dans les tissus végétaux et est généralement recueilli par goutte à goutte (Rubnov et *al*., 2001 ; Pasayevaet *al.*, 2020 ; Boyacioglu et *al.*, 2021). Chez *Ficus carica*, tous les organes de la plante peuvent exsuder du latex (Kitajima et al., 2018). Toutefois, la quantité peut varier en fonction des conditions physiologiques de la plante.

I.2.3 Latex

Le latex est le liquide blanc laiteux qui s'écoule après une coupure de la tige, les feuilles et les fruits non murs. Le principal composant protéique du latex de F. carica est la ficine, une protéase à cystéine de type papaïne (PLCP) qui se présente sous plusieurs isoformes (Zhai et *al.*, 2021). La ficine et d'autres PLCP telles que la papaïne (*Carica papaya L*., *Caricaceae*) et la bromélaïne (*Ananas comosus (L*.) Merr., Bromeliaceae) ont une activité protéolytique puissante et une large spécificité de substrat, justifiant une valeur commerciale élevée dans les industries pharmaceutique et alimentaire (Feijoo-Siota and Villa, 2011 ; Zhai et *al*., 2021).

Chez les plantes, les cystéine protéases (CP) sont impliquées dans le développement des plantes, les réponses aux stress biotiques/abiotiques, ainsi que dans la sénescence et la mort cellulaire programmée (Zhai et *al*., 2021); quant à eux, dans le latex végétal, ils interviennent dans les actions de défense pour protéger les fruits lors de la maturation des agents pathogènes tels que les insectes ou les champignons. Les protéases à cystéine peuvent attaquer directement les organismes envahisseurs, par exemple les insectes, en dégradant leur cuticule protectrice ou leur matrice péritrophique (Konno et *al*., 2004 ; Azarkan et *al.*, 2011). De plus, les CP sont également impliqués dans la coagulation du latex après des blessures abiotiques ou biotiques. Cette propriété de cicatrisation est une stratégie efficace pour protéger les plantes de l'invasion et de la propagation d'agents pathogènes (Azarkan et *al.*, 2011).

I.2.3.1 Ficine

Définition

La ficine est le nom donné pour l'enzyme protéolytique (endopeptidase) isolée à partir de latex des arbres du genre *Ficus*. Elle appartient à la famille des protéases à cystéine (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). La ficine est utilisée depuis l'antiquité pour la fabrication du fromage ou comme agent antihelminthique (Feijoo et *al.*, 2014).

Caractérisation de la ficine

Ficus carica, le figuier commun, est une source de protéases qui sont utilisés pour coaguler le lait (Azarkan, 2011), et en immuno-hématologie pour la recherche d'anti corps irrégulier (Bruneton, 2009), Son latex contient un agent protéolytique connu comme la ficine. Plusieurs études sont menées sur la purification et la caractérisation biochimique de la ficine, isolée à partir du latex de *Ficus carica*(Di pierro, 2014). Cependant, très peu de références sont disponibles sur les aspects structurels de la ficine jusqu'à ce jour par rapport à la papaïne, ainsi que d'autres protéases à cystéine connexes.

La ficine de *Ficus carica* est une chaîne polypeptidique unique ayant une masse moléculaire de 23,1 kDa. Elle appartient à la famille des protéases à cystéine (Devaraj, 2011). Elle 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) (Feijoo-Siota, 2011). L'enzyme est active à pH neutre et son inactivation complète se produit en dessous de pH 3,0 (Devaraj, 2011). Ainsi, la dénaturation induite par le pH de la ficine, conduit à un état partiellement plié à un pH acide. La structure dépliée partielle de la ficine à faible pH a montré les caractéristiques de globule fondu comme état intermédiaire comme étudié par différentes techniques biophysiques (Devaraj, 2009 ; Devaraj, 2011).

La ficine nécessite une cystéine ou d'autres agents réducteurs pour l'activation. Comme la papaïne, ell est inhibée par la cystéine de poulet et sa température la plus basse de l'inactivation est environ de 70°C (Grzonka, 2007).

Actuellement, il existe au moins cinq isoformes (A, B, C, D et S) de ficine dans les bases de données de protéines (Richter et *al*., 2002;Devaraj et *al*., 2008 ;Azarkan et *al.*, 2011). Cependant, différentes nomenclatures sont utilisées pour les isoformes de ficine caractérisées. Certains auteurs nomment l'ensemble d'enzymes simplement comme ficine, d'autres discriminent les isoformes comme ficine A, B, C à S, tandis que d'autres les appellent ficine I, II à V, selon l'ordre d'élution observé dans la chromatographie d'exclusion.

Importance économique

L'utilisation des protéases végétales été employées depuis des périodes antiques.

Le latex est utilisé par plusieurs communautés indigènes comme coagulant dans la production de fromage. Les enzymes du latex de figue peuvent être utilisées en combinaison avec la papaïne pour la dissociation des tissus et le détachement des cellules bactériennes dans les produits à base de viande en remplacement de la trypsine(Payne, 2009;Grzonka et *al.*, 2007). Utiliser aussi pour attendrir les saucisses fermentées et augmenter la libération de Listeria monocytogenes afin d'amélioré la sensibilité des tests pour détecter cet agent bactérien, qui est un pathogène intracellulaire ubiquitaire qui peut contaminer les aliments crus ou peu transformés.

La ficine convient comme enzyme protéolytique pour la production de certains types de fromages, en particulier ceux fabriqués à partir de lait de brebis. La ficine pourrait également être utilisée dans la fabrication de fromage à base de lait de vache ultrafiltré. En outre, il pourrait être utilisé avec succès pour la production d'hydrolysats de protéines de lait afin d'obtenir des ingrédients moins allergisants et une meilleure biodisponibilité pour des applications dans les préparations pour nourrissons et la nutrition gériatrique(Nouani et *al.*, 2009).

I.3. Coagulation du lait

La coagulation du lait constitue une forme ancestrale de conservation des protéines, de la matière grasse ainsi que d'une partie du calcium et du phosphore, dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans presque toutes les régions du globe (Abi-azar, 2007), en industrie fromagère, le procédé choisie pour la coagulation à un large effet sur la texture du produit fini (Herbert et *al.*, 1999).

I.3.1 Coagulation enzymatique du lait

La coagulation enzymatique est assurée par un grand nombre d'enzymes protéolytiques, d'origine animale, végétale ou microbienne, ayant la propriété de coaguler le lait. Il faut aussi tenir compte de leur grande activité protéolytique non spécifique supplémentaire qui leur permet d'hydrolyser les caséines α et β avec libération de peptides (Mietton, 1995). Si cette hydrolyse est trop élevée, il peut en résulter une baisse du rendement fromager, une texture molle et l'apparition de goûts anormaux. La présure est une enzyme protéolytique provenant de la caillette du veau non sevré. Cette enzyme correspond à deux fractions actives : l'une

mineure (20 %), constituée par la pepsine ; l'autre majeure (80 %), est représentée par la chymosine qui est le coagulant le plus utilisé (Eck, 1990). En pratique, la coagulation du lait peut se caractériser par trois paramètres: le temps de floculation, la vitesse de raffermissement et la fermeté maximale du gel (Caron et al., 1997).

I.3.1.1 Mécanisme de la coagulation enzymatique du lait

Un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou microbienne ont la propriété de coaguler le complexe caséinique.

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 chaine peptidique se trouve ainsi coupée en deux segments, le segment 1-105 est la paracaséine-κ **(Figure 1)** et le segment 106-169 qui est le caséine macropeptide (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 entraine une réduction de la charge négative et leurs degrés d'hydratation (Li J et *al.,* 2006).

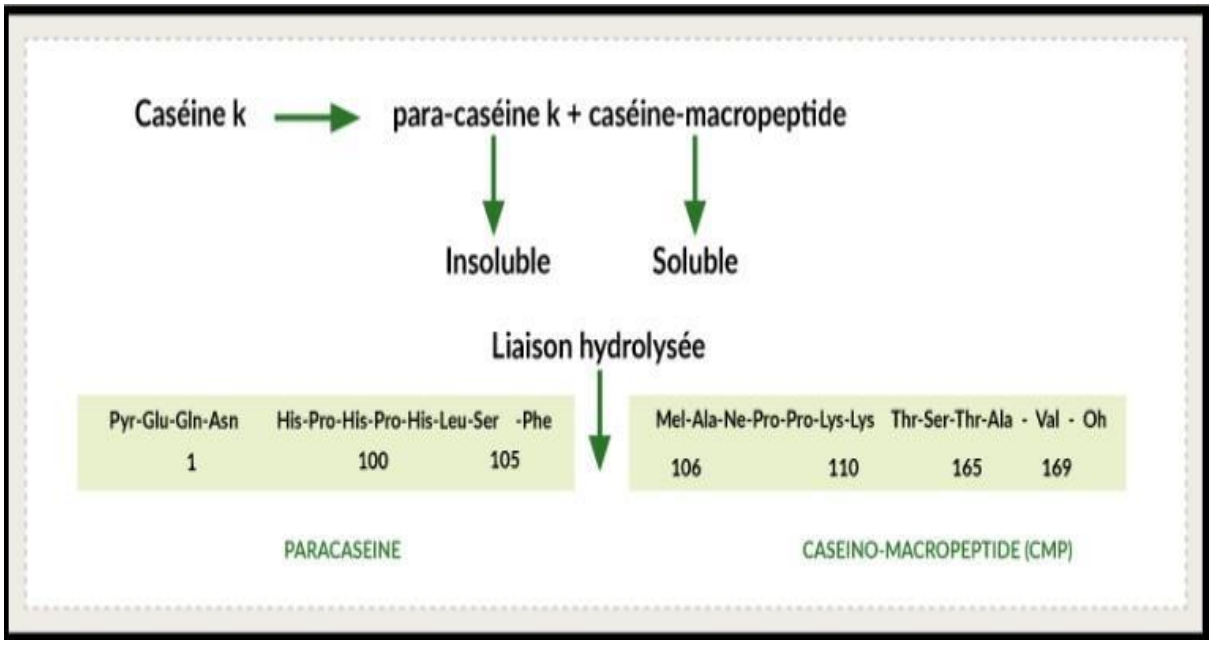


Figure1 : Hydrolyse de la caséine κ par la présure (Fox et al., 1994).

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 entraine la réduction des répulsions électrostatiques entre les micelles de caséines hydrolysées. L'élimination de ces macropeptides entraine 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^{2+}). Au début, il y a 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).

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire pédagogique de Biochimie appliquée situé au niveau de la faculté des sciences de l'université M'HAMED BOUGARA de Boumerdes (U.M.B.B) et le laboratoire de la Laiterie Fromagerie de Boudouaou (LFB). Il a pour objectif de remplacer les extraits enzymatiques obtenus à partir du figuier par de la présure commerciale, et leur efficacité coagulante sur le lait reconstitué.

II. 1. Présentation de l'unité LFB

La Laiterie Fromagerie de Boudouaou appartient à l'office régional du lait et des produits laitiers du centre (Orlac). Elle est située à l'entrée de la ville de Boudouaou dans la wilaya de Boumerdes. Depuis 1978, la LFB assure la production du lait de consommation, le fromage fondu stérilisé et le fromage à pâte pressée non cuite de type « EDAM ».

L'unité est composée d'une laiterie, une fromagerie, des caves d'affinage, des locaux de stockage de la matière première et de l'emballage du bâtiment administratif, un laboratoire d'analyse et de contrôle de la qualité physico-chimique et microbiologique et enfin, une station d'épuration des eaux. Elle emploie un effectif de 445 personnes.

II.2. Matériel

II.2.1. Matériel biologique

- **Latex**

Dans le cadre de caractériser l'extrait brut coagulant du figuier *Ficus carica L*., la matière première utilisée est le latex, un liquide blanc collant qui s'échappe des feuilles, des jeunes tiges et des fruits immatures.
La collecte du latex s'est effectuée durant la période de mois d'avril, dans la région de Dellys (Boumerdes), par incision manuelle de tiges de fruits verts et de jeunes tiges de branches principales.

Le latex a été collecté dans des flacons de 15 ml, dont le volume total récupéré pour cette étude est d'environ 60 ml. Le latex, ainsi frais, à été transporté au laboratoire dans une glacière.

Après centrifugation à 5000 tr /min pendant 20 minutes à 4°C, trois phases sont récupérées (figure 2):

- ✓ **Une phase supérieure** : représente la gomme, environ 10 à 15 % du volume total.
- ✓ **Une phase inférieure** : constituée de déchets mélangés à la sève lors d'écoulements.
- ✓ **Une phase intermédiaire :** Le surnageant, qui contient l'extrait brut de l'enzyme. (Gagaoua et *al*., 2014)

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

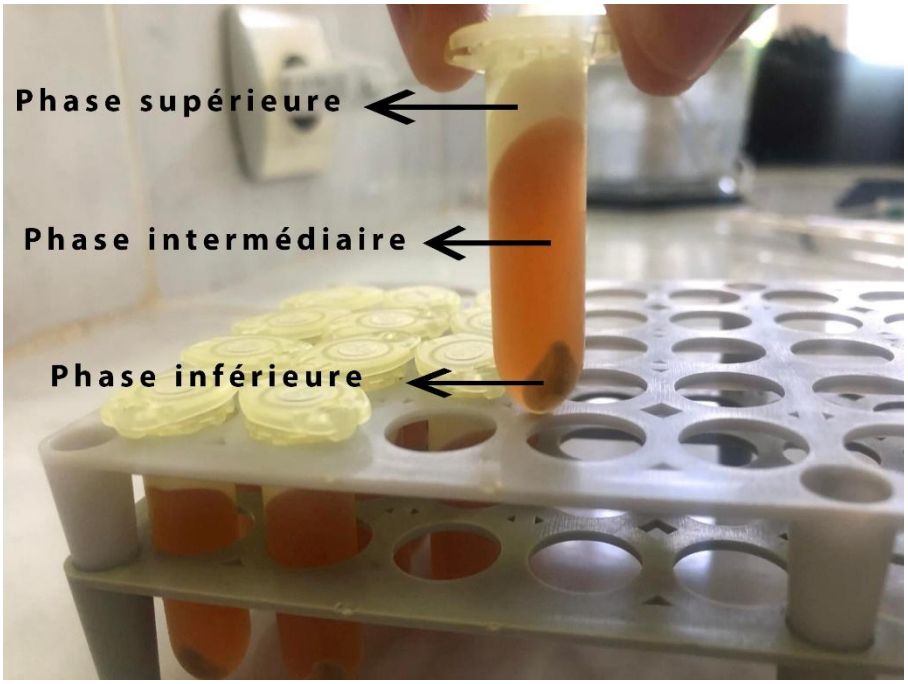


Figure 2: Photographie des différentes phases constituant le latex

• Enzymes coagulantes :

- **Chymosine bovine recombinante Chy-Max (Christian Hansen Lab. (Denmark) :** qui nous a été fournie gracieusement par la Laiterie LFB boudouaou (wilaya de Boumerdes) ;
- **Coagulant microbien** : produit commercialisé par l'entreprise FOOD MANIA.

II.2.2. Matériel non biologique

L'appareillage, la verrerie, les solutions et réactifs utilisés sont représentés dans l'annexe 1.

II.3. Méthodes

II.3.1. Caractérisation physico-chimique de l'extrait brut de la Ficine, présure et du coagulant microbien

II.3.1.1. Mesure du pH

Le potentiel hydrogène (pH) est mesuré directement à l'aide d'un pH-mètre qui affiche la valeur à l'écran, après avoir trompé l'électrode dans un bêcher contenant la solution de l'extrait enzymatique.

II.3.1.2. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants est réalisé selon la méthode de Lowry et *al.* (1951)(Annexe 2).Le principe de cette méthode se base sur la coloration bleue développée par les protéines suite à une réaction entre le réactif de Folin et les acides aminés, principalement la tyrosine et le tryptophane et à un degré moins la cystéine et l'histidine.

La densité optique (DO) mesurée au spectrophotomètre visible à 750 nm permet de déterminerla concentration protéique contenue dans les extraits.

La concentration en protéines, des extraits enzymatiques, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage avec la protéine du sérum albumine bovine (BSA à 200 µg /ml) réalisée dans les même conditions expérimentales que les échantillons (Annexe 2).

II.3.1. 3. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de l'extrait brut de la ficine, de la présure et du coagulant microbien est évaluée selon deux méthodes, à savoir la mesure de l'activité protéolytique et l'évaluation de l'activité coagulante.

- ✓ **Évaluation de l'activité coagulante**

L'activité coagulante est déterminée selon la méthode de Berridge (1955) modifiée par Collin et *al.* (1977). Cette méthode consiste à déterminer visuellement dans des conditions standardisées les premiers flocons de la coagulation du substrat de Berridge. Cette activité est exprimée en unité d'activité coagulante (U.A.C) ou d'unité présure (UP) qui est définie par la

quantité d'enzyme contenue dans 1mL de la solution enzymatique qui peut coaguler 10 ml de substrat standard de Berridge en 100 secondes à 35°C Benyahia et *al*.,(2010).

Le substrat de Berridge est préparé par l'addition de 12 mg de lait écrémé à 100ml de solution de $CaCl_2$ (0,01M). Après 30 minutes d'agitation lente, le pH est ajusté à 6,4

L'activité coagulante exprimée en Unité Présure (UP) est calculée selon l'expression suivante :

$$\mathbf{U.A.C\ (UP)} = \frac{\mathbf{100 \times V}}{\mathbf{10 \times t \times v}}$$ Où :

UP : unité présure ;

V : volume de lait (substrat de Berridge) ;

10 : volume du substrat standard (10 mL) ;

100 : temps de coagulation du substrat standard (100 secondes) ;

v : volume de l'extrait d'enzyme ;

t : temps de floculation en secondes ;

L'activité coagulante peut être également exprimée par la force coagulante (F), représente le nombre de volume de lait frais coagulé par un volume d'extrait coagulant, pendant un temps de 15 min à 35°C (Bouacherine et Ouchene, 2017). La force coagulante (F) est calculée selon la formule suivante :

$$\mathbf{F} = \frac{\mathbf{9\ 00 \times V}}{\mathbf{t \times v}}$$

Avec :

V: volume du lait.

v : volume d'extrait enzymatique.

t : temps de floculation en secondes.

900 : temps de coagulation du substrat standard (15min) x 60 secondes.

- ✓ **Détermination de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique est déterminée selon la méthode décrite par Green and 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.

En effet, l'activité protéolytique de nos extraits enzymatiques est déterminée en employant la caséine comme substrat. Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par une protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés.

L'activité protéolytique est mise en évidence par un dosage colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Lowry et *al.* (1951).

L'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard (Annexe 3).

L'activité protéolytique, exprimée en µg/h.ml**,** correspond à la libération de 1µg de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans 1mL de substrat.

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

II.3.2. Détermination des conditions optimales d'activité coagulante

II.3.2.1. Effet de la température sur l'activité coagulante

L'influence de la température a été déterminée en mesurant l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de la ficine, présure ainsi que le coagulant microbien à différentes températures (30C° ; 35C° ; 40C° ; 45C° ; 50C° ; 55C° ; 60C° ; 65C° ; 70C° ; 75C° ; 80C° ; 85C°) et en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique. Le substrat est préparé dans les mêmes conditions, à savoir une concentration en $CaCl_2$ de 0,01M, et un pH = 6,4.

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).

II.3.2.2. Effet du pH sur l'activité coagulante

Le pH joue un rôle important dans l'activité enzymatique, et par conséquent sur le temps de floculation du lait (Huppertz et *al*. 2006).

Pour déterminer l'influence du potentiel hydrogène (pH) du lait sur l'activité coagulante, l'étude a été réalisée en mesurant l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de la ficine, présure ainsi que le coagulant microbien, dont les essaies sont réalisés dans les mêmes conditions de température et de concentration en $CaCl_2$, mais à différents pH. Le pH du lait a été ajusté pour les valeurs de 5,5 ; 6,0 ; 6,5 ; 7,0 ; 7,5, par l'addition des solutions de HCl (0,1N) ou de NaOH (0,1N).

Le choix de cet intervalle de pH est basé sur le fait qu'à des valeurs de pH inferieurs à 5 la coagulation peut devenir une coagulation acide. L'augmentation du pH à des valeurs supérieures à 7 peut provoquer l'inactivation de la protéase employée (Huppertz, Upadhyay et *al*. 2006).

II.3.2.3. Effet de la concentration de $CaCl_2$ sur l'activité coagulante

L'influence de la concentration en $CaCl_2$ du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de la ficine, présure ainsi que le coagulant microbien a été étudiée à des conditions optimales (température = 65°C et à pH=5,5), en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique, préparé avec différentes concentrations en $CaCl_2$:0,005M ; 0,01M ; 0,02M ; 0,03M ; 0,04M ; 0,05M.

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

III. Caractérisation de la poudre de lait

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

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

III.1.1 Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité (H) du lait et de la poudre du lait est déterminé, par étuvage à 103±2°C, selon le protocole décrit par ISO (1998).

Le taux d'humidité (H %) est alors calculé, selon la formule suivante :

$$H(\%) = 100\text{-}MS\ (\%)$$

III.1.2 Détermination de l'acidité (Dornic)

L'acidité de la poudre de lait est déterminée par titrimétrie, par la soude (0,1N) jusqu'à pH 8,4, d'un volume de solution de poudre de lait dissoute dans l'eau distillée. L'acidité titrable de la poudre de lait, est donnée par l'expression :

$$A = 10\ (\ V\ /\ V')$$

Avec :

A : quantité d'acide lactique en (g/l)

V : volume de la solution de NaOH utilisé (ml)

V' : volume de l'échantillon (ml)

Pour obtenir l'acidité tétrable en degrés DORNIC (°D), la valeur de A est multipliée par 10 ou 1°D représente 0,1 g d'acide lactique par litre de lait

III.1.3 Détermination de la teneur en matière graisse (MG)

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

La technique consiste à mettre dans le butyromètre, un volume de 10ml d'acide sulfurique, qui sera par suite additionné d'un volume de 11ml d'eau distillée, de 2,5g de poudre de lait et d'un volume de 1ml d'alcool amylique. L'ensemble est bien homogénéisé, et centrifugé pendant 5minutes à 1200 tr/min. La teneur en matière grasse est exprimée en g /l :

$$\mathbf{MG\ (g\ /l) = (B-A)\ x\ 100}$$

A : la valeur correspondant au niveau inferieure de la colonne grasse

B : la valeur correspondant au niveau supérieur de la colonne grasse

III.1.4 Mesure du potentiel d'hydrogène (pH)

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

Le pH est déterminé directement en utilisant un pH-mètre électronique et ce après avoir plongé l'électrode dans un bêcher contenant une solution de poudre de lait à analyser (Solution à 10% de poudre de lait dans de l'eau déminéralisée). La valeur du pH est lue directement sur l'écran de l'appareil.

III.2 Analyse microbiologique de la poudre du lait

Le lait en poudre est un produit très riche en éléments nutritifs qui peuvent favoriser la croissance de microorganismes divers, notamment dans les cas où l'hygiène et les conditions de fabrication, ainsi que celles du conditionnement ne sont pas respectées, c'est pour cette raison que des analyses de contrôle de la qualité de la poudre de lait soient menées avant la reconstitution.

Dans cette partie on s'intéresse à l'évaluation de la qualité microbiologique du lait en poudre. De façon spécifique, il sera nécessaire de rechercher et de dénombrer des espèces

bactériennes présentes dans produit laitier « poudre de lait ». Les analyses sont effectuées selon le Journal officiel république algérien (JORADPN°35,1998).

III.2.1 Préparation de la solution mère et des dilutions

Préparation de la solution mère à partir de 25 g de poudre de lait, et 250 ml d'eau physiologique. La préparation des dilutions décimales se fait à partir de la SM. Transférer 1ml de la SM dans un tube de 9 ml d'eau physiologique pour obtenir la dilution 10^{-1}, on refait la même procédure à partir de la dilution 10^{-1} pour obtenir la dilution 10^{-2}, et ainsi de suite.

III.2.2 Recherche et dénombrement de la flore totale aérobie mésophile

La flore aérobie mésophile à 30°C représente l'ensemble des microorganismes qui se développant en présence d'oxygène. Cette microflore peut comprendre des microorganismes pathogènes pour l'homme mais aussi des microorganismes d'altération, leur détection traduit une altération qui amoindrit la qualité intrinsèque de la denrée (goût, odeur, aspect) (Bonnefoy et *al.* 2002).

Principe : Les microorganismes aérobies et aéro-anaérobies facultatifs, peuvent se développer dans un milieu nutritif non sélectif (Plate Count Agar). Incubés à 30°C pendant 72 h (Guiraud, 2012).

• A partir des dilutions décimales ajouter 1ml de chaque dilution choisie (10, 10^{-2}) dans une boite de Pétri.

• Ajouter 15 ml de milieu PCA à chaque boite de Pétri, ensuite mélanger soigneusement en faisant des huit et laisser les boites jusqu'à ce que le contenu devienne solide.

• Incuber les boites de Pétri à 30°C pendant 24 h.

III.2.3. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux

Le dénombrement des coliformes dans le lait permet la mise en évidence d'une pollution fécale et donc la possibilité d'une contamination par des entérobactéries pathogènes (Guiraud, 2012). Le dénombrement des coliformes est effectué sur milieu sélectif solide, le desoxycholate lactose AGR (DLA), puis incubé à 30°C pendant 24 h pour la numération des coliformes totaux et à 44°C pendant 24 heures pour compter les coliformes fécaux.

III.2.4. Recherche et dénombrement de Clostridium sulfito-réducteurs

La mise en évidence des clostridiums sulfito-réducteurs est réalisée après élimination de la forme végétative, et activation des spores par le chauffage au bain-marie, l'action sulfito-réductrice des spores est mise en évidence dans un milieu viande-foie. Après chauffage de l'échantillon à 80°C pendant10min, puis ajouter 5ml du milieu VF (viande-foie) additionné de sulfite de sodium et d'alun de fer et couche de vaseline, puis incubation à une température de 44°C pendant 24h.

III.2.5. Recherche des Salmonelles

La gélose Hektoen est un milieu sélectif qui permet l'isolement des bactéries du genre *salmonella* qui sont des entérobactéries pathogènes.

Principe : Un processus de recherche correspondant à un pré- enrichissement voire un enrichissement, est suivi d'un isolement sur milieu gélosé sélectif (Ceae ,2013).

- Enrichissement : 100ml du milieu SFB (bouillon sélénite céstéiné tamponné) est ensemencés par 10ml de la SM et incubés à 37°C pendant 24h.
- Isolement : A l'aide d'une anse de platine une goutte du bouillon d'enrichissement SFB est prélevée et ensemencée en stries sur une gélose Hektoen préalablement coulées et laissées refroidir dans des boites de Pétri, l'incubation est faite à 37°C pendant 24h.

III.2.6. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

La mise en évidence de *Staphylococcus aureus* est réalisée sur le milieu sélectif des *Staphylococcus* à coagulase positive.

Principe : Leur recherche repose sur l'emploie de deux milieux de culture, milieu GC (Giolitti Contoni) comme milieu d'enrichissement et milieu Chapman comme milieu d'isolement sur une boite de Pétri contenant le milieu Chapman, un ensemencement en surface à raison de 0,1ml de la SM est effectué puis incuber à une température de 37°C pendant 24 à 48h.

L'apparition de colonies lisses pigmentées en jaune indique la présence de *Staphylococcus aureus*.

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1 Caractéristiques physico-chimiques des extraits enzymatiques

L'extraction de la ficine brute à partir du latex de *Ficus carica L.* est effectuée par centrifugation (5000 tr/min pendant 20 min à 4C°) et trois phases ont été récupérées, dont la phase intermédiaire représente l'extrait enzymatique de la ficine. Les caractéristiques physicochimiques de l'extrait enzymatique de la ficine obtenu ainsi que la pésure animale et le couagulant microbien sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques de l'extrait enzymatique brut de la ficinprésure animale et le coagulant microbien.

Caractéristiques	Extrait brut de la ficine	Présure animale	Coagulant microbien
Couleur	Marron foncé	Blanche	Marron clair
Texture	Peu visqueux	Poudre	Liquide
pH	5,7±0,1	-	6,3
Rendement (%)	79	-	-
Teneur en protéines (mg/ml)	900	0,395	9,45
Activité protéolytique (µg/ml/min)	1422	6,665	100
Activité enzymatique spécifique (UP/mg)	1,58	16,87	10,58
Activité coagulante UP	372,02	881,41	55,56
Force coagulante	33482	79327	5000

L'extrait de la ficine obtenu est une solution acide (pH=5,4), de couleur marron foncé avec un aspect peu visqueux, avec une odeur fruitière prononcée. Ces caractéristiques sont confirmées par les résultats de Nouani et *al*. (2009) et Maamar et Zaidi (2019).

La récupération du système enzymatique à l'état brut à partir du latex de figuier est de 79% (47,4ml de ficine pour 60ml du latex). Ce résultat est proche à celui obtenu par Siar (2014), qui l'ont estimé à 71,42%.

III.1.2 Dosage des protéines des extraits enzymatiques

Selon la méthode de Lowry, en se référant àla courbe d'étalonnage réalisée avec la BSA dans les mêmes conditions expérimentales, la concentration des protéines de l'extrait brut de la ficine de *Ficus carica L*. est estimée à **900 ±7,6** mg/mL. Cette teneur en protéine est largement supérieure à celle obtenue par Devaraj (2008) évaluées à **150**mg/ml.

Selon les travaux de Nouani et *al*. (2009) la teneur en protéine de l'extrait enzymatique brut est relativement faible par rapport à la masse de la matière première employée. Celle du figuier est de 4 fois environ plus élevée que celle de l'artichaut (22 mg/ml contre 5,6 mg/ ml) avec un rendement protéique est successivement de 11 et 2,02%. Par ailleurs Fadýloğlu (2001), a retrouvés des taux compris entre **116** à **156**mg/ml.

Cette différence de teneur en protéines peut s'expliquer par un certain nombre de facteurs ; toutefois la période de récolte, la maturité des fruits, le facteur variétal, la conduite agronomique et le climat. (Durand and Chantraine, 1982;Boulkara et brahimi,2018).

La même méthode de détermination de la concentration des protéines est suivie pour la présure animale et le coagulant microbien.
L'extrait enzymatique dilué de la présure animale est obtenu par macération de 1,6g de poudre de présure animale dans 100 ml d'eau distillée, se caractérise par une teneur en protéines de **0,395±0,15** mg/ml, alors que l'extrait enzymatique du coagulant microbien est caractérisé par une teneur en protéines de **9,45±0,2** mg/ml.

La teneur en protéines de l'extrait d'origine végétale (ficine) et beaucoup plus élevé comparé à l'extrait d'origine animale et microbienne, ceci est dû à la composition en protéines du

liquide de latex de *F. carica* qui contient plusieurs formes d'enzymes protéolytiques. (Liener et Friedenson, 1970 ; Akar et Fadiloglu, 1999).

III.1.3 Activité coagulante

D'après les résultats obtenus (Tableau I), l'extrait brut de la ficine possède une activité coagulante de **372,02** UP, cette valeur se rapproche de celle trouvée par Wiliams et *al*. (1968) et Lazzouni (2016), qui ont trouvé la même valeur estimée à **320** UP. Ceci contraste avec Maamar et Zaidi (2019) et Leulmi (2016) avec des valeurs respectives de 253 PU et 201,56 PU.Cependant beaucoup plus faible que celles signalées par Nouani et *al.* (2009), qui est estimée à 1500 PU.

La force coagulante de l'extrait brut de la ficine obtenu est de **1/33482**. En termes de quantité de lait coagulable, 1ml de cet extrait enzymatique peut coaguler environ 33 litres. Cette valeur est inférieure à ceux indiquées par Nouani et *al*. (2009) et Siar (2014), qui sont estimés à 1/40000, 1/42059 respectivement. Toutefois plus élevé que ceux observés par Bouacherineet Ouchene (2017) et Maamar et Zaidi (2019) qui l'ont évalué à 1/21258, 1/22771 respectivement.

L'activité spécifique de la ficine est de **1,58** U/mg. Ce résultat se rapproche de celui obtenu par Siar (2014) évalué à **1,35** U/mg, et inferieure à celui de Bouacherine et Ouchene (2017) de l'ordre de**2,478** U/mg.

Extrait enzymatique dilué de présure animale présentant une activité coagulante de 881,41 UP. Ce dernier est beaucoup plus élevé que l'extrait enzymatique dilué du coagulant microbien évalué à 55,56 UP.

Les résultats obtenus de la présente étude montrent que l'extrait d'origine animale (présure) a une activité coagulante, force coagulante supérieure par rapport à l'extrait végétal (ficine) et nettement supérieure à l'extrait microbien (coagulant microbien).

La comparaison de ces résultats avec d'autres enzymes végétales traditionnellement utilisées dans la fabrication du fromage, comme la cardosine, montre que la ficine est dotée d'une activité et force coagulante et d'un taux en protéines supérieurs à ceux des cardosines obtenus par différents auteurs (Martins et *al*. 1996 ; Nouani et *al*., 2009).

III.1.4 Activité protéolytique

Toutes les enzymes coagulantes qu'elles soient d'origine animale, végétale ou microbienne, sont capables d'hydrolyser la caséine κ, 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 α et β (Vignola, 2002).

D'après les résultats obtenus (Tableau I), l'activité protéolytique, exprimée par le taux de tyrosine libéré, de l'extrait brut de la ficine, la présure animale et du coagulant microbiensont representés dans la figure 3.

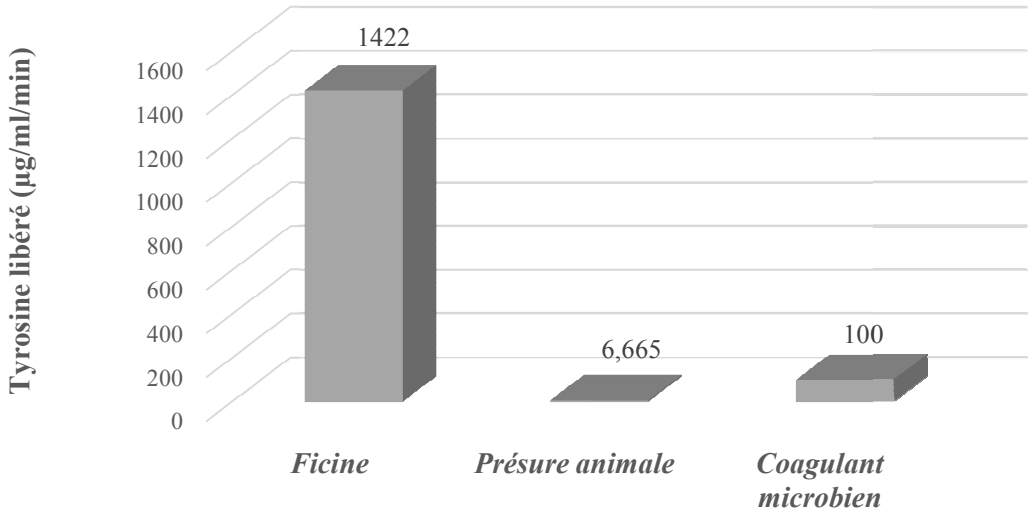


Figure 3 : Activité protéolytique exprimée par le taux de tyrosine libéré pour l'extrait brut de la ficine, la présure animale et du coagulant microbien

L'étude de l'activité protéolytique de la présure animale et du coagulant microbien en comparaison avec l'extrait brut de la ficine par la méthode de Green et Stackpoole (1975), ont montré que l'extrait brut de la ficine (**1422**µg/mL.min) s'est avéré beaucoup plus élevée que celle du coagulant microbien (**100**µg/mL.min) et supérieur à celuide la présure animale (**6,66**µg/mL.min).

L'activité protéolytique de l'extrait brut de la ficine obtenu (**1422** µg/mL.min), est supérieure à celle obtenue par Bouacherine et Ouchene (2017) et Maamar et Zaidi (2019) qui ont trouvé**139** µg/ml.min, **358** µg/ml.min respectivement.

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), et elle est due à son action non spécifique envers les autres caséines (α et β) (Fox et Mcsweeney,1998).

III.2 Conditions optimales de l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudies

Plusieurs facteurs influent sur la coagulation, comme la concentration enzymatique, 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). Afin de déterminer les conditions physico-chimiques optimales de l'action d'extrait brut de la ficine, nous avons essayé de voir l'influence de certains paramètres sur son activité coagulante par comparaison à la présure animale et le coagulant microbien.

III.2.1 Effet de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques

L'influence de la température sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine est déterminée en mesurant l'activité coagulante aux différentes températures d'incubation (de 30 à 85 °C) avec un intervalle de 5 °C.
Les résultats obtenus, de l'influence de la température sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine, sont représentés dans la figure 4.

D'après les résultats obtenus, une augmentation de l'activité coagulante de la ficine au fur et à mesure de l'élévation de la température du lait, suivant les températures étudiées. L'optimum d'activité coagulante pour l'extrait de ficine est obtenu à une température du lait égale à 85°C avec une activité de **9689** UP. L'augmentation de la température du lait entraine une amélioration très nette de l'activité coagulante de la ficine.

Ce résultat est plus proche des résultats de Nouani et *al.,* (2009) évalué à 80°C et de Bouacherine et Ouchene (2017) qui est de 75°C, et supérieure à celle donné par Siar (2014) qui est estimé à 70°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 Bekhit et *al*., 2013).

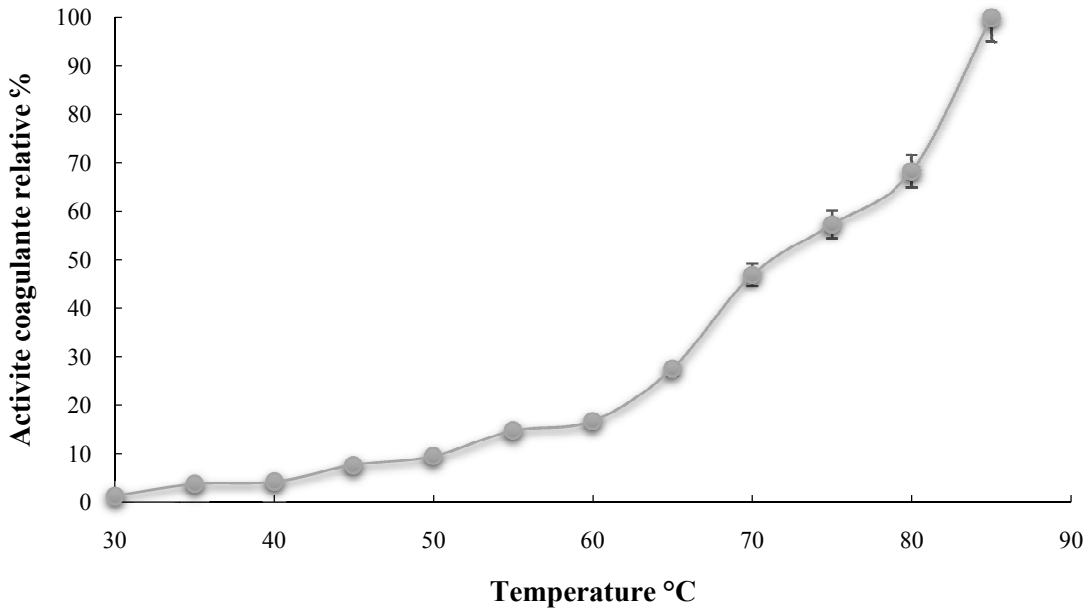


Figure 4 : Effet de température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine.

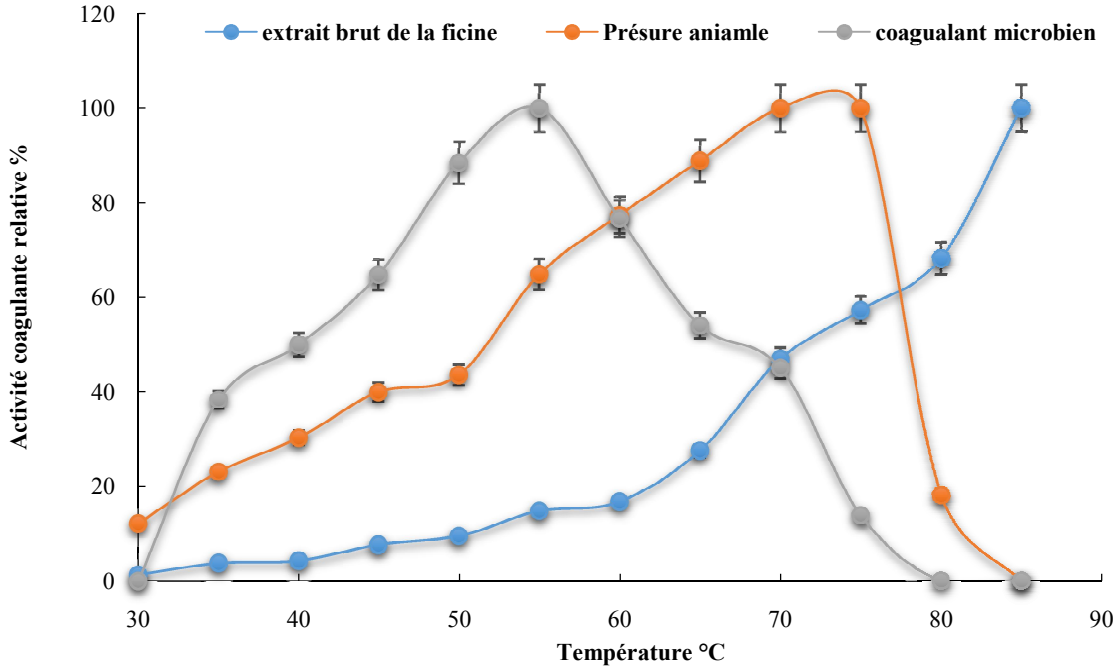


Figure 5 : Activité coagulante relative des extraits coagulants en fonction de la température du lait.

Les résultats de la figure 5 indiquent que l'activité coagulante des deux solutions augmente progressivement avec la température jusqu'à atteindre un maximum à 70°C pour la présure animale et 55°C pour le coagulant microbien.

L'augmentation de l'activité coagulante est due à l'accélération de la réaction enzymatique par hydrolyse de la caséine κ.

L'activité coagulante diminue sensiblement à des températures supérieures à l'optimum enregistré pour les deux coagulases (animale et microbienne), jusqu'à la perte de l'activité enzymatique,en raison de la dénaturation (Özer, Akardere et *al*. 2010; Kumar, Sathyaselvabala et *al*. 2012; Bayraktar and Önal 2013.

D'après les résultats de Slamani (2003) et Outaleb (2006), l'activité optimale d'un extrait enzymatique purifié de la pepsine ovine est de 52°C avec une inactivation complète à 62°C, ce qui confirme nos résultats.

Toutefois, il faut noter que l'effet de la température résulte de la conjugaison de deux effets, l'un sur la réaction enzymatique, l'autre sur la phase secondaire de la coagulation et qui correspond à l'étape d'agrégation. En effet, la coagulation du lait ne peut avoir lieu qu'à des températures supérieures ou égales à 18 °C. Cela est due à l'importance des interactions hydrophobes dans l'agrégation des micelles hydrolysées (Brinkhuis and Payens, 1984, Lucey, 2002).

III.2.2 Effet du pH du lait sur l'activité coagulante

L'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine, a été étudié en ajustant le pH du lait (substrat de Berridge) aux valeurs de l'intervalle 5,5 à 7. La température d'incubation est fixée à 35 °C et la concentration en $CaCl_2$ est de 0,01M. Le pH optimal de coagulation du lait est déterminé par observation du temps de floculation le plus court. La figure 6 donne l'évolution de l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine étudiée en fonction du pH du lait.

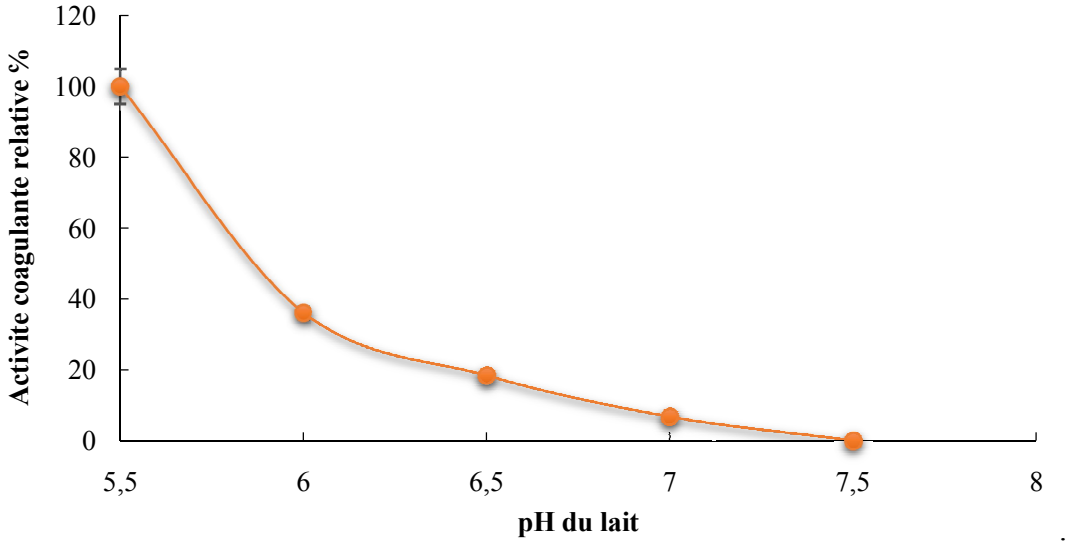


Figure 6 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine.

Les résultats obtenus montrent que le pH optimal pour l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine étudié est de 5,5 avec une activité optimale d'environ de **1984,13** UP, cette activité passe à **718,39** UP à un pH 6,0. Ce résultat est proche de ceux donnés par Nouani et *al*. (2009) et Siar (2014), qui ont estimé que le pH optimal d'activité coagulante pour la ficine est de 5.

Le pH joue un rôle très important dans la coagulation de lait, sur la solubilisation du phosphate de calcium micellaire. La diminution de la charge nette des molécules de caséines et dissociation de caséine de la micelle avec un pH optimum de l'hydrolyse de la caséine-κ entre 5,1-5,5, donc lorsque le pH diminue, l'affinité de l'enzyme pour les micelles augmente et entraîne une augmentation de la vitesse de réaction. (Fadýloğlu, 2001).

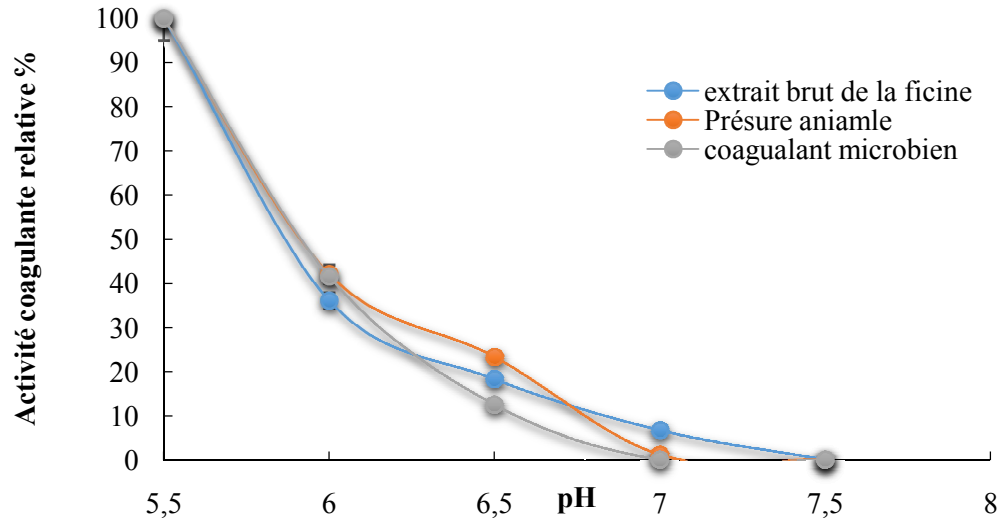


Figure 7 : Activité coagulante relative des extraits coagulants en fonction du Ph du lait.

L'évolution de l'activité coagulante de la présure animale et le coagulant microbien en fonction du pH suit une allure comparable à celle de la ficine (figure 7).

A pH 7,0, l'activité coagulante des deux enzymes (présure animale et le coagulant microbien) est inhibée, toutefois la ficine montre encore une faible activité coagulante a ce pH. En effet, les extraits étudiés montrent un caractère acide (activité coagulante optimale à pH 5,5).

Les résultats présentés par la (figure 7) indiquent une diminution de l'activité coagulante des trois préparations enzymatiques au fur et à mesure que le pH du lait augmente.

Selon Ramet (1990), l'abaissement du pH de 7.0 à 5.2 provoque la diminution du temps de coagulation. En effet, l'acidification du lait favorise la réaction d'agrégation par suite à la

diminution de la stabilité des micelles, liée à la neutralisation des charges négatives et à la libération d'ions calcium.

Morsli (1997) a montré que la cynarase de l'artichaut et de la ficine du latex de figuier présentent une bonne activité coagulante jusqu'à pH 6,6 par contre, Mouzali (2001) indique un pH optimum égale à 5,2 pour l'extrait brut de Cardon, et Fernani (2003) a constaté une activité optimale au pH égale à 5,5 pour la protéase purifiée des graines de melon.

III.2.3 Effet de la concentration en $CaCl_2$

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 la pasteurisation du lait, les industries ajoutent du $CaCl_2$ à une dose de 80 à 200 mg/l améliorant ainsi l'aptitude à la coagulation du lait (Jeantet et *al*., 2008).

La concentration optimale en $CaCl_2$ du lait est déterminée en mesurant le temps de coagulation du lait additionné de quantités de $CaCl_2$ variant de 0,005 à 0,05 M. La figure 8montre l'influence de la concentration en $CaCl_2$ sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine.

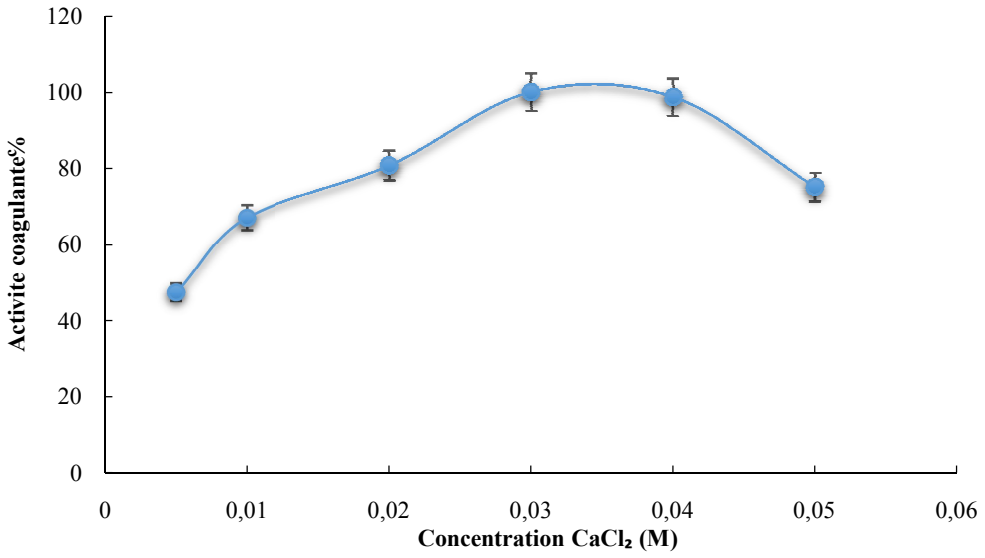


Figure 8 : Effet de la concentration en $CaCl_2$ sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la ficine.

D'après les résultats obtenus nous constatons que dans l'intervalle de concentration en $CaCl_2$ étudié, l'activité coagulante augmente avec la concentration en $CaCl_2$. L'optimum d'activité

pour l'extrait brut de la ficine estimé à **555** UP est obtenu à une concentration de **0,03** M. Cette concentration est confirmée par Siar (2014) et Bouacherine et Ouchene (2017). Cependant supérieure à celle signalée par Nouani et *al*., (2009) évaluée à **0,02** M de $CaCl_2$.

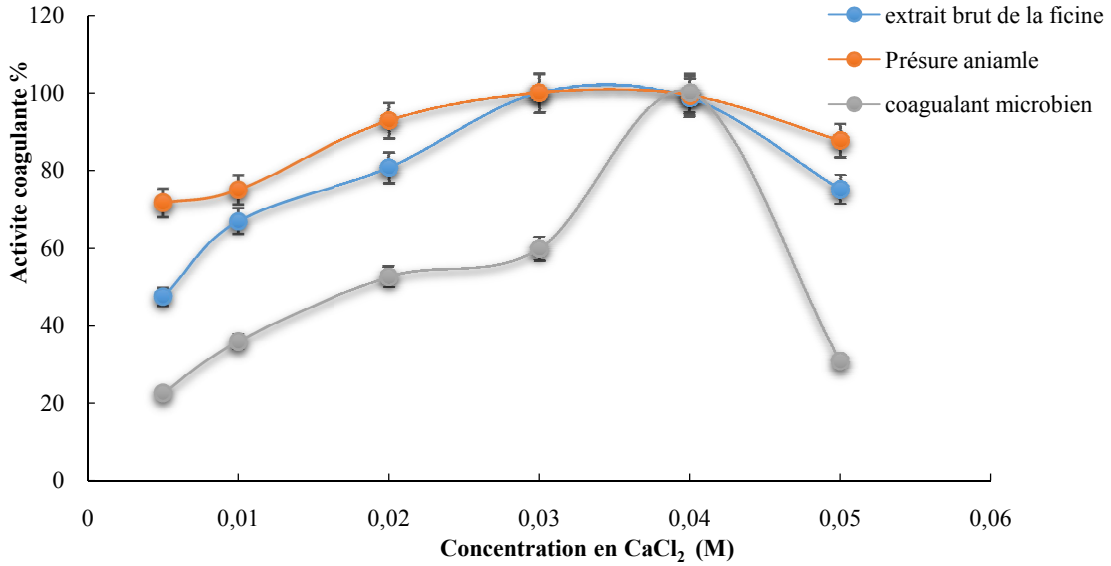


Figure 9 : Activité coagulante relative des extraits coagulants en fonction de concentration en $CaCl_2$ du lait.

D'après la figure 9, on a constaté que l'activité coagulante des extraits enzymatiques de la presure et du coagulant microbien augmente avec l'addition du $CaCl_2$ jusqu'à une concentration de 0.03 mol (**1175** UP) et 0.04 mol (**155** UP) respectivement, au-delà, une baisse d'activité est enregistrée.

Le rôle du calcium ionique qui est très influent sur le temps de coagulation et la fermeté du gel pourrait s'expliquer par le masquage de groupements chargés et l'accroissement de l'hydrophobicité qui intervient dans le phénomène de réticulation (Eck et Gillis, 1997).

Selon Nôel et *al*. (1989), l'addition de calcium à pH constant n'a pas d'influence sur la réaction d'hydrolyse enzymatique mais elle accélère la réaction d'agrégation des micelles hydrolysée, ainsi il est bien établi que la phase de gélification est purement chimique, et elle dépend étroitement de la teneur en calcium.

En revanche, l'excès de calcium provoque une inhibition de la coagulation, du fait qu'il bloque certains sites réactifs indisponibles pour la réticulation des molécules de para caséine, induisant ainsi une précipitation partielle des caséines du lait (Baumy et Brulé, 1986 ; Mc Mahon et *al.*, 1984).

III.3. Caractérisation physico-chimique et microbiologique de la poudre de lait

III.3.1. Analyses physico-chimiques de la poudre de lait

L'analyse physico-chimique est un outil important dans le processus de fabrication qui consiste à mettre à la disposition du consommateur des produits sains et loyaux.

D'après les résultats obtenus, la poudre de lait de type *low heat* utilisée durant notre étude est conforme et répond aux normes AFNOR(1986).

Tableau 2 :Résultats des analyses microbiologiques de la poudre de lait

Détermination	Résultats	Norme	Référence
pH	6,74	6,6 – 6,8	Norme AFNOR(1986)
Humidité	3,5	2 - 5%	Norme AFNOR(1986)
Acidité Dornic (°D)	15°D	15 - 18	Norme AFNOR(1986)
Matière grasse total MG(%)	0 %	0 %	Norme AFNOR(1986)

En effet, les résultats enregistrés (**Tableau 2)** à savoir : 6,74 ; 15 °D; 3,5% ; 0% qui sont attribués respectivement aux paramètres suivants : pH, acidité Dornic, taux d'humidité et le taux de matière grasse se situent dans l'intervalle de conformité de chaque paramètre.

III.3.2. Analyses microbiologiques de la poudre de lait

Les analyses microbiologiques permettent de vérifier que le produit ne présente pas de risque pour la santé du consommateur, en tenant compte des conditions de conservation, des habitudes de consommation et des caractéristiques du produit.
Il convient donc de s'assurer, par des tests microbiologiques, que le produit va être sain et de bonne qualité marchande tout au long de sa durée de vie.

Les résultats des analyses microbiologiques de la poudre de lait sont consignés dans le Tableau 3.

Tableau 3 :Résultats des analyses microbiologiques de la poudre de lait

Bactérie	Température d'incubation	Temps d'incubation	Résultats	Norme	Référence
Germes totaux	30°C	72h	0,1. 10^2	≤2. 10^5	Journalofficiel N°5 27mai 1998
Coliformes totaux	30°C	24h	Négative	10^2	Journalofficiel N°5 27mai 1998
Coliformes fécaux	44°C	24h	Négative	10	Journalofficiel N°5 27mai 1998
Clostridium Sulfito réducteur	44°C	24h	Négative	30	Journalofficiel N°5 27mai 1998
Salmonelles	37°C 37°C 37°C	24h 24h 24h	Négative	Négative	Journalofficiel N°5 27mai 1998
Staphylococcus aureus	37°C	24h -48h	Négative	10^2	Journalofficiel N°5 27mai 1998

Les analyses microbiologiques montrent que la poudre de lait répond aux exigences de qualité fixées par les normes (journal officiel de la république Algérienne N°5 le 27mai 1998), une absence totale des germes pathogènes (*Clostridium***,** *Staphylococcus aureus*, Salmonelles) et de la flore de contamination (Coliformes fécaux et totaux).

Conclusion

Ce travail est entrepris afin d'étudier la possibilité de substituer la présure (d'origine animale et microbienne) par l'extrait brut de la ficine (d'origine végétale). Ce dernier est utilisé dans les pratiquestraditionnelles pour la coagulation du lait.

Le but de l'étude visait en premier lieu, la caractérisation de l'extrait enzymatique obtenus à partir du figuier et et leur efficacité coagulante sur le lait reconstitué.

Notre démarche a comporté deux étapes. Premièrement la récupération de la matière première d'origine végétale renfermant le système enzymatique recherché, l'extraction de l'extrait enzymatique brut de ficine, la préparation de la solution de présure et la caractérisation des extraits du point de vue activité protéolytique, coagulante et force coagulante et conditions optimales d'activité (température, pH, concentration en $CaCl_2$ et concentration d'enzymes).

En second lieu, une étude comparative d'un extrait brut de ficine avec des présures disponibles dans le commerce a été étudiée.

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

L'extrait de la ficine obtenu est une solution acide (pH=5,4), de couleur marron foncé avec un aspect peu visqueux, avec une odeur fruitière prononcée. La récupération du système enzymatique à l'état brut à partir du latex de figuier est de 79% (47,4ml de ficine pour 60ml du latex). Une activité protéolytique de 1422 µg/mL.min pour l'extrait brut de ficine, estimée 14 fois plus élevée que celle de la présure microbienne, une activité protéolytique spécifique de 1,58 UP/mg de protéine, une activité coagulante de 372,02 UP et une teneur en protéines de

900mg/ml.

Une activité protéolytique de 6,665±0,50 µg/mL.min pour la présure animale, une activité protéolytique spécifique de 16,87UP/mg de protéine, une activité coagulante de 881,41 UP et une teneur en protéines de 0,395 mg/mL.

Une activité protéolytique de 100±0,50 µg/mL.min pour le couagulant microbien, une activité protéolytique spécifique de 10,58 UP/mg de protéine, une activité coagulante de 55,56 UP et une teneur en protéines de 9,45 mg/mL.

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 brut de ficine et de présure est le même que celui du coagulant microbien évalué à 5,5. 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 85°C, la présure à 70°C et le coagulant microbien à 55°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 le coagulant microbien il est de 0,04 M.

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. Cependant il est intéressant de compléter cette étude par :

✓L'étude des différents facteurs influençant l'extraction de cet enzyme afin d'améliorer la qualité et le rendement d'extraction ;

✓La purification et l'optimisation de l'enzyme afin d'envisager d'autres utilisation ;

✓Aussi il est intéressant d'essayer d'appliquer l'extrait de la ficine pour la fabrication de

fromage.

Références bibliographiques

ABBAS K., (2012). Effet de traitements thermiques sur les propriétés fonctionnelles de fromages traditionnels : Le cas des pâtes persillées. Thèse de Doctorat en sciences des sciences de la vie, sante, agronomie, environnement, Université Blaise Pascal.

ABD-EL-RAHMAN A.M., MADKOR S.A., SHALABI S.I. AND METTWALL N.H., (1990). Rabbit pepsin as a rennet substitut. I- Extraction, purificatio, and characterization of the enzyme. Minia. J. Agric. Res. And Dev., 12 (3): 1685- 1702.

AHMAD S., BHATTI F. R., KHALIQ F. H., IRSHAD S., & MADNI A., (2013). A review on the prosperous phytochemical and pharmacological effects of Ficus carica. International Journal of Bioassays, 2, 843-849.

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

AGGAD H., MAHOUZ F., AMMAR Y ET KIHAL M (2009). Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. 160:590-595.

ABI-AZAR R., (2007). Complication des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier: propriétés technologiques des coagulums obtenus [Thèse de Doctorat]: Ecole doctorale ABIES. 196 p.

AKAR B AND FADILOGLU S., (1999). Teleme production by purified ficin. Journal of Food Quality.671- 680.

ALAIS C., (1971). Les enzymes coagulantes, la technique laitière. 79 : 63-65.

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

ALMEIDA C.M ANDSIMÕES I., (2018). Cardoon-based rennets for cheese production. Applied Microbiology and biotechnology,102,4675-4686.

ANDREN A., ROGINSKI H AND FUQUAY J., (2002). Rennets and coagulants in Encyclopdia of daiy science, 281-286.

AZARKAN M., MATAGNE A., WATTIEZ R., BOLLE L., VANDENAMEELE J AND BAEYENS-VOLANT D., (2011). Selective and reversible thiol-pegylation, an effective approach for purificationand characterization of five fully active ficin (iso) forms from Ficus carica latex.Phytochemistry 72:1718-1731.

AIDER M., (2021). Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates. JDS Commun 2. 10.3168/jdsc.2020-.0073.

BADGUJAR S., PATEL V., BANDIVDEKAR A., MAHAJAN R., (2014). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Ficus carica: a review. Pharm Biol 52:1487–1503.

BAROLO MI., RUIZ MOSTACERO N., LÓPEZ SN., (2014). Ficus carica L. (Moraceae): an ancient source of food and health. FoChem 164:119–127.

BAYRAKTAR H., AND ÖNAL S., (2013). Concentration and purification of α galactosidase from watermelon (Citrullus vulgaris) by three phase partitioning. Separation and Purification Technology 118:835-841.

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

BEKA R. G., (2011). Une alternative végétale en fromagerie: Préparation d'un extrait coagulant à partir des fruits de Balanites aegyptiaca; Etude biochimique et application technologique. Thèse de doctorat en Sciences Ingénierie des Fonctions Biologiques de l'Université de Lille l. 167p.

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.

BENKAHOUL M., (2016). « Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité coagulante des protéases de deux chardons endémiques, Galactites tomentosa et Onopordum acanthium ». Université des frères mentouri constantine, Thèse.

BENGANA M., (2001). Caractérisation des enzymes protéolytiques (pepsine/chymosine) isolées à partir des caillettes de bovins adultes. Mémoire Magister. Science Agronomique, I.N.A., El–Harrach.

BENYAHIA-KRID F., ATTIA H., AND ZIDOUNE M., (2010). Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: interactions and microstructure. Journal of Agriculture, Biotechnology and Ecology 3:75-86.

BOULKARA M., BRAHIMI A., (2018). Extraction de la ficine de l'espèce Ficus carica et étude de ses caractéristiques biochimiques et de son effet antimicrobien sur quelques espèces bactériennes pathogènes.

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

BOUACHERINE M., OUCHENE Z., (2017). Valorisation d'un savoir faire Kabyle pour son application industrielle: Caractérisation d'un fromage à pâte molle famouaqué à partir du lait de vache coagulé avec l'enzyme du Ficus carica L, Université de Bouira.

BONNEFOY C., GUILLET F., LEYRAL G. et BOURDAIS E-V., (2002). Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaire. In : Science des aliments. p 45, 79, 83, 103. Ed. Doin.

BOYACIOĞLU O., KARA B., TECIMEN S ET AL (2021). Antiproliferative effect of Ficus carica latex on cancer cell lines is not solely linked to peroxidase-like activity of ficin. Eur J Integr Med 45: 101348.

CAVALCANTI M. T. H., TEIXEIRA M. F. S., LIMA-FILHO J. L., & PORTO A. L. F. (2004). Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by Nocardiopsis sp. Bioresource Technology, 93, 29–35.

CUVELLIER G.F., (1999). Production des enzymes. In: Biotechnologie. Goor. Scriban R., 5e ed., 345 – 363.

DALGLEISH, D. G., BRINKHUIS, J., ET PAYENS, T. A. (1981). The coagulation of differently sized casein micelles by rennet. European Journal of Biochemistry, 119(2), 257-261

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

DEVARAJ K.B., GOWDA LALITHA R. et PRAKASH V., (2008). 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., (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.

DOMSALLA A., & MELZIG M. F., (2008). Occurrence and properties of proteases in plant

latices. Planta Medica. 74,699–711.

DURAND J. R., and CHANTRAINE J. M., (1982). L'environnement climatique des lagunes ivoiriennes. Revue d'Hydrobiologie Tropicale 15:85-113.

ECK., (1990). Le Fromage 3eme Edition, Techniques et Documentation, Lavoisier, family in fig (Ficus carica L.): genome-wide analysis and expression patterns. Front Plant Sci 12:1–14

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

ECK A., GILLIS J., (2006). Le fromage. 3eme édition : Tec et Doc, Lavoisier. Paris.

FACCIA M., PICARIELLO G., TRANI A., LOIZZO P., GAMBACORTA G., LAMACCHIA C., Di LUCCIA A., (2012). Proteolysis of Cacioricotta cheese made from goat milk coagulated with caprifig (Ficuscaricasylvestris) 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.

FERNANI L. (2003). Obtention et caractérisation d'une protéase coagulant le lait à partir de gain de melon cucumis melon L. Thèse Magister en Sciences agronomiques, Université de M'Hamed Bouguerra, Boumerdes, Algérie.

FEIJOO S., BLASCO L., LUIS R. J. (2014). Recent patents en microbial proteases for the dairy industry, n 1, 8: 44-55.

FEIJOO S., VILLA T. G., (2011). Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. Food Bioprocess Technol 4: 1066–1088.

FLAISHMAN M. A., RODOV V., & STOVER E. (2008). The fig: botany, horticulture, and breeding, 34,119-125.

FOX P.F., (1969). Milk clotting and proteolytic activities of bovine, pepsine and porcine. J .Dairy. Research. Vol: 36. P 427-433.

FOX P.F., SINGH T.K. et MC SWEENELY P.L.H., (1994). Proteolysis in cheese during.

FOX P., et MCSWEENEY P., (1998). Dairy Chemistry and Biochemistry. UK: Blackie Académie and Professions.

GAGAOUA M., BOUCHERBA N., BOUANANE-DARENFED A., ZIANE F., NAIT-RABAH S., HAFID K., and BOUDECHICHA H.R., (2014). Three-phase partitioning as an

efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (Ficus carica L.) latex. Separation and Purification Technology 132:461-467.

GRAINDY P., (1978). Détermination de l'activité enzymatique d'extraits coagulants d'origine animale. Technicien du lait,n. 83,p.p. 5-47.

GREEN M. L. and STACKPOOLE A., (1975). "The preparation and assessment of a suitable Mucor pusillus Lindt proteinase–swine pepsin mixture for Cheddar cheese-making." Journal of Dairy Research 42(2): 297-312.

GRZONKA Z., KASPRZYKOWSKI F., et WICZK W., (2007). Cysteine proteases. CHAPTER 11. J. Polaina and A.P. MacCabe (eds.), Industrial Enzymes, p181–195.

GONZÁLEZ-VELÁZQUEZ D., MAZORRA M., MIGUEL A., MARTÍNEZ P., HUERTA-OCAMPOJOSÉ A., VALLEJO C.B., MORA-CORTESWENDY G., MORENO H.J.M. AND RAMÍREZ S.J.C., (2021). Exploring the Milk-Clotting and Proteolytic Activities in Different Tissues of Vallesiaglabra: a New Source of Plant Proteolytic Enzymes. Applied Biochemistry and Biotechnology, 193:389–404.

GORDIN S., ROSENTHAL I., BRNSTEIN S., et NOVROT C., (1978). Pepsine du poulet utilisée comme succédané de la présure de veau dans la production du fromage. Congrès Int. Laitier. Paris. Vol: 11. P 447-448.

GUIRAUD J-P. et ROSEC J-P., (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. p 96, 136, 183,199, 200, 238. AFNOR. France.

GUIRAUD JP., (2003). Microbiologie Alimentaire. Edition Dunod. Paris. pp : 136-139.

HUPPERTZ T., UPADHYAY V., KELLY A., and TAMIME A., (2006). Constituents and Properties of Milk from Different Species. Brined cheeses, Blackwell Publishing Ltd.

HERBERT S. A., RIAUBLANC B., BOUCHET D., GALLANT J., AND DUFOUR E., (1999). Fluorescence spectroscopy investigation of acid or rennet-induced coagulation.

HUSEK U., SEDEK M., (1981). Expérience avec la pepsine du poulet utilisation en fromagerie. Netherlands Milk .Dairy J. Vol: 35. P 302-306.

IUBMB., (1998). Life 5 ; 46: 857-1070 .

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

JISHA V.N., SMITHA R.B., PRADEEP S., SREEDEVI S., UNNI K.N., SAJITH S., PRIJI P., JOSH M. S., & BENJAMIN S., (2013). Versatility of microbial proteases. Advances in Enzyme Research, 1(3), 39–51.

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

JOURNAL OFFICIELLE DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE. (1993). Arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation, N° JORA : 069 du 27-10-1993.

JORADP n°35 (1998). Arrêté interministériel du 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologique de certaines denrées alimentaires.

KITAJIMA S., AOKI W., SHIBATA D., NAKAJIMA D., SAKURAI N., YAZAKI K., MUNAKATA R., TAIRA T., KOBAYASHI R., ABURAYA S., SAVADOGO E.H., HIBINO S., YANO H., (2018). Comparative multi-omics analysis reveals diverse latex-based defense strategies against pests among latex-producing organs of the fig tree (Ficus carica). Planta 247:1423–1438

KONNO K., HIRAYAMA H., NAKAMURA M., TATEISHI K., TAMURA Y., HATTORI M., KOHNO K., (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. Plant J 37: 370–378.

KUMAR A., SHARMA J., KUMAR MOHANTY A., GROVER S., & KUMAR B.V., (2006). Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (Capra hircus). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 145, 108–113.

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.

LANSKY E.P., & PAAVILAINEN H.M., (2011). Traditional herbal medicines for modern times: Figs the Genus Ficus. ED. Taylor and Francis Group, LLC Chemical Rubber Company Press, 357.

LAPOINTE-VIGNOLA C., (2002). Science et technologie du lait: transformation du lait, Presses inter Polytechnique.

LAW B.A., (2010). Enzymes in dairy product manufacture. In: Whitehorst, Ort, editors. Enzymes food technology. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell. p. 8896.

LAZZOUNI., (2016). Hydrolyse des caséines bovines par des protéases végétales en vue de réduire leur allergénicité.

LEULMI, I. (2016). Hydrolyse enzymatique des caséines bovines par la ficine et les cardosines, mémoire en vue d obtenir des peptides antimicrobiens en vue de l'obtention de diplôme de magister

LI J., and DALGLEISH D., (2006). Mixed coagulation of milk–gel formation and mechanism. J Agric Food Chem 54:4687-4695.

LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.I., ET RANDALL R.J., (1951). Protein measurement with the Follin phenol reagent. J. Biol. Chem., N°193: 265- 275.

LOWE G., (1976). The cysteine proteinases. Tetrahedron.vol. 32: 291 – 302
LUCEY, J.K.(2002). Rennet coagulation of milk In: Encyclopedia of Dairy Science.Ed., H.Royinski, J.Fuquay and P.Fox, Elsevier science Ltd, p. 286-293.

LYNN K., R. et CLEVETTE-RADFORD N. A., (1986).ficin e, a serine-centred protease from FicusElastica*; J'hyfocht&rry. 25: 1559-1561.

RICHARDSON G., et CHAUDAR R., (1970). Difference between Calf and adult bovine rennet. J. Dairy. Research.N°10. Vol: 53. P 1367-1370.

MACHOU DJ., (2004). Extraction et purification de protéases coagulants le lait en vue de leur substitution à la présure traditionnelle : Essai d'obtention d'une protéase issue d'estomac de poisson (Seriola dumerili). Mémoire de Magister. Génie alimentaire. Faculté des Sciences de l'ingénieur. Boumerdes.

MAHAUT M., JEANTET R., ET BRULÉ G., (2000). Initiation à la technologie fromagère. Ed.Tec et Doc, Lavoisier, Paris 194 p.

MARTINS A., VASCONCELOS M., SOUSA R., (1996). Flower as a coagulant agent for cheese making. Short characterization. Le Lait, 76:473-477.

MARINHO C.R., et TEIXEIRA S.P., (2019). Novel reports of laticifers in Moraceae and Urticaceae: revisiting synapomorphies. Plant Syst Evol 305:13–31.

MATHIEU U., (1981). Présure, pepsine bovine et protéases acides en fromagerie. Circulaire du 28 janvier 1981, Technique laitière. Vol: 954.P 51-52.

MEHRAJ H., SIKDER R. K., HAIDER, M. N., HUSSAIN, M. S., & JAMAL UDDIN, A. F. M. (2013). Fig (Ficus carica L.): a new fruit crop in Bangladesh. International Journal of Business, Social and Scientific Research, 1, 1-5.

MICHEL A., (2002). Larousse agricole.

MIETTON B., (1995). La typologie des fromages, Symposium organisé par la fondation des Gouverneurs et le centre de recherche et de développement sur les aliments d'agricultures et Agroalimentaire Canada, octobre, 245p.

MILK. (1999)J Dairy Sci 82:2056 –2062 .monocytogenes. Int J Food Microbiol 334:108851 Paris.

MORSLI A. (1997), Recherche sur les activités protéasiques des extraits de Cynara scolymus de latex de ficus caria et du pro ventricule de Gallus gallus en vue de leur utilisation en technologie fromagère .Thèse Mag .sces agro., Inst..Nati Agro EL Harrach, 181p.

MOUZALI., (2001). Extraction enzymatique et caractérisation de l'agent coagulant de la fleur de cardon sauvage (cynara cardunculus L) Mémoire Mag .Sces agro., Inst .Nati .,Agro., El-Harrach ,84p.

MAZRI C., HAMMER EL AIN S., SIAR H., (2018). Characterization and Application of Phytochemicals Substances of the Fig Tree: Biological and Sensory Characterization of Ficin and Cheeses"Fresh and Soft". Asian Journal of Applied Science and Engineering, Volume 7, No 2/2018 ISSN 2305-915X(p); 2307-9584(e).

NASSAR A. H., et NEWBURY H. J., (1987). Ficin Production by Callus Cultures of Ficuscarica. J. PlantPhysiol. 131: 171-179.

NOUANI A., BELKHODJA R., MACHOU D., FERNANI L. ET BELLAL M.M., (2002). Recherche et caractérisation de quelques succédanés de présure en vue de leur utilisation dans la technologie fromagère. 1er Séminaire international sur la qualité et la sécurité dans le secteur agroalimentaire. Blida 13 et 14 Mai.

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

PHILIPPS W., (2018). Proteases-human food. In Enzyme in Human and Animal Nutrition, 1st Edition, Kumar, Carlos Simões Nunes and Vikas, Elsevier Inc., United States 267-277.

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.

OUKABLI A., (2003). Le figuier : Un patrimoine génétique diversifié a exploité. Transfer Génétique en Agriculture. 106: 2-4.

OUTALEB T., (2006). Aptitude à la coagulation du lait par la pepsine ovine. Mém.Ing.Agr., Institut National Agronomique, El Harrach (Alger), 54p.

ÖZER B., AKARDERE E., ÇELEM E.B., and ÖNAL S., (2010). Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. Biochemical Engineering Journal 50:110-115.

PAŞAYEVA L., ÖZALP B., FATULLAYEV H., (2020). Potential enzyme inhibitory properties of extracts and fractions from fruit latex of Ficus carica-based on inhibition of α-amylase and α-glucosidase. J Food Meas Charact 14:2819–2827.

PHILIPPS-WIEMANN P., (2018). Proteases—human food. Enzymes in Human and Animal Nutrition. POLAINA, J., AND MACCABE, A. P. (2007). Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. New York: Springer.

POZA M., SIEIRO C., CARREIRA L., BARROS-VELAZQUEZ J., VILLA T.G., (2003).I.Ind Biotechnol. Vol: 30. P 691-698.

RAMET J.P., (1990). Les agents de transformation du lait. In: Fromage. Coord. Eck A. Tech. Et Doc. Lavoisier, Paris : 101 – 105.

RAMET J.P., (1997). Les agents de transformation du lait; la présure et les enzymes coagulantesIn: Le fromage. Ed., A. Eck, 3ème ed., Technique et documentation Lavoisier, p.101-107, 539p.

RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S and DESHPANDE V.V., (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev 62:597-635.

RICHTER G., SCHWARZ H.P., DORNER F., TURECEK P.L., (2002). Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from Ficus carica. British J Haematol 119:1042–1051.

ROBBINS B.H., (1930). A proteolytic enzyme in ficin, the anthelmintic principle of leche de higueron. J. Biol. Chem. 87: 251_257.

ROYINSKI, J.FUQUAY AND P.FOX, Elsevier science Ltd, p. 286-293.

RUBNOV S., KASHMAN Y., RABINOWITZ R., SCHLESINGER M., MECHOULAM R., (2001). Suppressors of cancer cell proliferation from fig (Ficus carica) resin: isolation and structure elucidation. J Nat Prod 64:993–996 Smeets S.R., 1995: Enzyme coagulation. Dairy technology paper, 5 (2): 14 – 16.

SLAMANI R., (2003). Optimisation d'une méthode d'extraction de la pepsine ovine. Essai de purification et de caractérisation. Mémoire de Magister. Sciences alimentaires INA. El-Harrach.

SALHI-HANNACHI A., CHATTI K., SADDOUD O., MARS M., RHOUMA A., MARRAKCHI M., TRIFI M., (2006). Genetic diversity of different Tunisian fig (Ficus carica L.) collections revealed by RAPD fingerprints. Hereditas 143:15–22.

SHAMSUZZAMAN K. ET HAARD N.F., (1985). Coagulation du lait et aptitude en technologie fromagère d'une enzyme analogue à la chymosine extraite de la muqueuse du phoque. J .Food. Biochem. Vol: 9. P173-180.

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.

SHAH M.A., AND MIR S.A., (2018). Plant Proteases in Food Processing. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature. J.-M. Mérillon, K. G. Ramawat (eds.), Bioactive Molecules in Food, Reference Series in Phytochemistry.

SCHMIDT D., (1982). Association of caseins and casein micelle structure. Developments in dairy chemistry.

UHLIG H., (1998). Industrial enzymes and their applications. New York: Willey & Sons.

TUBESHA Z.A AND AL-DELAIMY K.S., (2003). Renning-like Milk coagulant enzyme produced by a local isolate of Mucor. International J.Dairy Technology. N°4. Vol: 56. P 237-241.

KUMAR P. S., RAMALINGAM S., SATHYASELVABALA V., KIRUPHA S. D., MURUGESAN A., & SIVANESAN S. (2012). Removal of cadmium(II) from aqueous solution by agricultural waste cashew nut shell. Korean Journal of Chemical Engineering, 29(6), 756–768.

VATIĆ., MIRKOVIĆ N., MILOŠEVIĆ J.R., JOVČIĆ B., POLOVIĆ ND., (2020). SBroad range of substrate 891p.

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

WALALI L. D., SKIREDJ A., et ELATTIR H. (2003). L'amandier, l'olivier, le figuier, le grenadier. Transfer Génétique en Agriculture, 105: 1-3.

WHITEHURST R. J. et VAN O. M., (2010). Enzymes in Food Technology. 2èmeedition. Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1-405-18366-6.

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 (Ficuscarica cv. Sabz) latex. Phytochemistry 87: 16–22.

ZHAO X., CAI M., YANG Z.J., (2019). Purification and characterization of a novel milk-clotting enzyme produced by Bacillus amyloliquefaciens GSBa-1. Eur Food Res Technol 245, 2447–2457.

ZHAI Y., CUI Y., SONG M., VAINSTEIN A., CHEN S., MA H., (2021). Papain-like cysteine protease gene specificities in papain and fig latex enzymes preparations improve enumeration of Listeria .ripening. 1-32 p.

ZIKIOU A., (2013). La coagulation du lait par l'extrait des fleurs de chardon (Cynaracardunculus). Thèse de magistère, université Constantine -1-,136p.

Annexes

Annexe 1 : Matériel non biologique :

- **Appareillage**

Agitateur magnétique, balance électronique et balance de précision, pH –mètre, bain-marie, centrifugeuse, spectrophotomètre UV-visible.

- **Petit matériel**

Micropipettes, papier filtre, différents types de verrerie (béchers, fioles jaugées, pipettes graduées, tubes à essais, entonnoirs…).

- **Produits chimiques et réactifs**

• **Sels et tampons :**carbonate de sodium, monopotassium phosphate, sodium-potassium tartrate, sulfate de cuivrepenthydraté, tri-sodium citrate dihydraté.

• **Colorants et réactifs :** réactif de Folin-Ciocalteu, l'acide trichloracétique.

Annexe 2 : Dosage des protéines (Lowry et al. 1951)

1. **Solutions :**

Solution (A) : 5 % Na2CO3	
Solution (B):0,5 % Cu SO4, 5 H2O dans 1 % sodium-potassium tartrate	
Solution (C):	50 ml **(A)** + 2 ml **(B)** (à préparer immédiatement)
Solution (D) : NaOH (1 N)	
Solution (E) : Réactif de Folin-Ciocalteau dilué 1 / 2.	

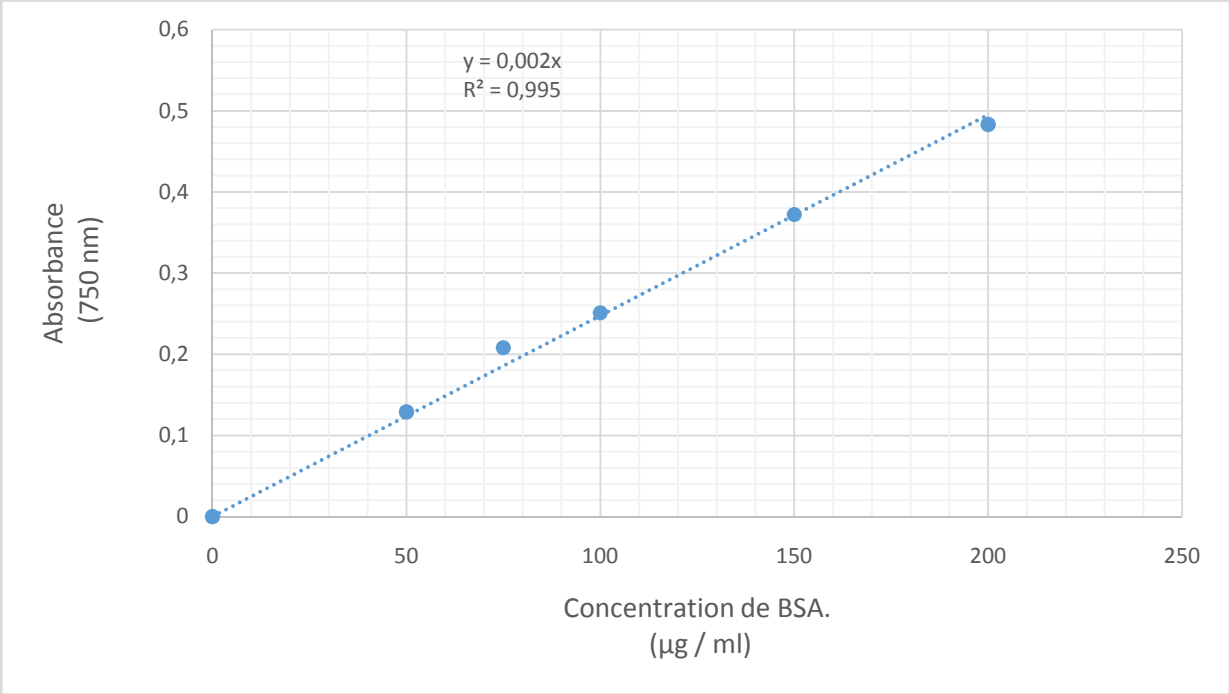
2. Méthode de mesure :

2.1. Courbe étalon de B.S.A. :

N° du tube / Solutions et réactifs	Blanc	1	2	3	4	5	6
Concentration de Solution de BSA. (200 µg / ml)	0	25	50	75	100	150	200
Volume deSolution de BSA prélevé (ml)	0	0,125	0,250	0,375	0,5	0,750	1
Eau distillée (ml)	1	0,875	0,750	0,625	0,5	0,250	0
Solution (D) (ml)	0,5						
Solution (C) : (ml)	2,5						
Laisser reposer pendant 10mn							
Solution(E) : (ml)	0,5						
Incuber pendant 30 min à l'obscurité							

3. Lecture de l'absorbance :

La lecture de la densité optique est effectuée à 750 nm après avoir étalonner le spectrophotomètre avec le témoin.



Courbe étalon de la BSA.

Annexe 3 : Mesure de l'activité protéolytique (Green et Stackpoole, 1975) :

1. Solutions :

Solution alcaline (A) : Soude caustique (NaOH) + (2g/500ml) Carbonate de sodium	500ml + 10g
Solution cuivrique(B) : Sulfate de cuivre 5 H_2O (0,32g/100ml) + Tartrate de sodiumetde potassium(1g/100ml)	2ml + 2ml
Solution (C) : Solution(A) +Solution (B)	50ml + 1ml
Solution (D) : réactif de Folin-Ciocalteau dilué au1/2.	

2. Courbe d'étalonnage de la tyrosine :

Mode opératoire :

N° du tube / Réactif et solutions	Blanc	1	2	3	4	5
Concentration de tyrosine (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Volume de tyrosine prélevé (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Solution (C) (ml)	5					
Incuber pendant 10 mn à 35°C						
Solution (D) (ml)	0,5 (agiter immédiatement)					
Incuber pendant 20 mn à 35°C						
Lecture de l'absorbance (660 nm)	0	0,0061	0,158	0,227	0,298	0,356

Conditions d'hydrolyse :

Ajouter 1 ml de la solution enzymatique à 1 ml de la solution de caséine à 2 % (P/ V) dans le tampon citrate de sodium pH 5,2.

Incuber pendant 10,30, 60, 90 et 180 mn. À 35°C. Après incubation, ajouter 5 ml de T.C.A. (12 %) (P/V). Laisser reposer 15 mn.

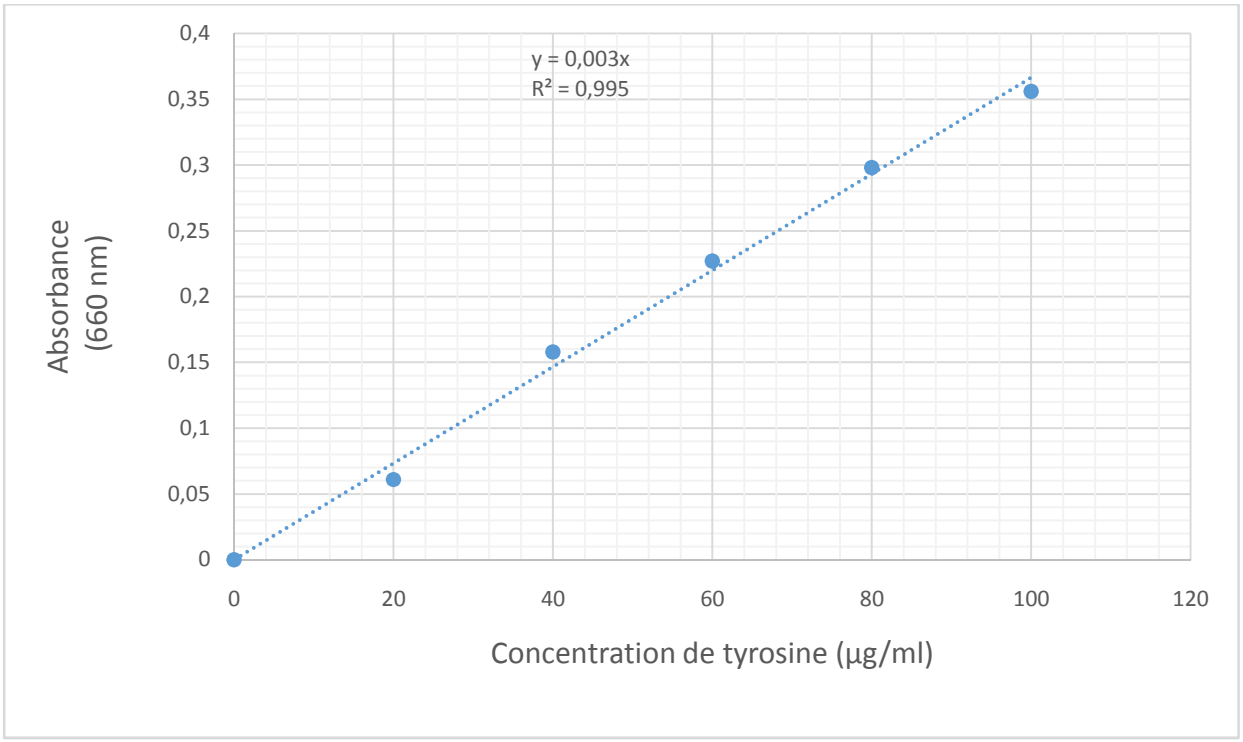
Filtrer à travers du papier filtre.

Préparation du blanc

A 1 ml de la solution caséinique sont ajoutés 5 ml du T.C.A. (12 %). Ajouter enfin 1 ml de la solution enzymatique.

Lecture de l'absorbance

La lecture de la densité optique se fait au spectrophotomètre après étalonnage à une longueur d'onde 660nm.



Courbe étalon de la tyrosine.

Abstract :

The present comparative studyaims at evaluating the possibility of substituting commercial enzymaticextracts of rennetobtainedfrommicrobial and animal sources withficinextractedfrom the latex of the figtree*Ficus carica*L.

The investigatedficinwascharacterized by the determination of its coagulant activity, coagulant force and proteolyticactivity on reconstitutedmilk. Additionally, the effect of some physico-chemicalparameterssuch as the temperature, pH and CaCl2 concentration on the coagulation efficiencywasalsodetermined. The resultsfromficinwerecomparedagainst the coagulation activity of commercial rennet and microbial coagulant.

The results of thiswork show that the crudeextract of ficin has a coagulant activity of 372,02 UP, a coagulant force of 33482, and an estimatedproteolyticactivity of 1422 µg/ml/min of tyrosine equivalent/ml/min with an optimal conditions of pH of 5,5, temperature of 85°C, and CaCl2 concentration of 0,04 M.

In comparison to theseresults, the rennet and microbial coagulant have respectively a coagulant activity of 881,41 and55,56 UP, a coagulant force of 79327 and 5000, and an estimatedproteolyticactivity of 6,665 and 100µg/ml/min of tyrosine equivalent/ml/min. The optimal conditions werefound to be a pH of 5,5 and 5,5, a temperature of 70°C and55°C, and CaCl2 concentration of 0,03 and 0,04 M.

Theseresultsdemonstratethatficin has a comparable coagulant activity to that of the rennet and microbial coagulant, highlightingitspotential use in the cheeseindustry.

Keywords: Ficus carica, ficine, coagulating agent, rennet, coagulation of milk.

Résumé :

La présente étude comparative vise à évaluer la possibilité de substituer des extraits enzymatiques commerciaux de présure obtenus à partir de sources microbiennes et animales par de la ficine extraite du latex du figuier *Ficus carica* L.

La ficine étudiée a été caractérisée par la détermination de son activité coagulante, de sa force coagulante et de son activité protéolytique sur du lait reconstitué. De plus, l'effet de certains paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH et la concentration de CaCl2 sur l'efficacité de la coagulation a également été déterminé. Les résultats de la ficine ont été comparés à l'activité de coagulation de la présure commerciale et du coagulant microbien.

Les résultats de ce travail montrent que l'extrait brut de ficine a une activité coagulante de 372,02 UP, une force coagulante de 33482, et une activité protéolytique estimée de 1422 µg/ml/min d'équivalent tyrosine/ml/min avec des conditions optimales de pH de 5,5, température de 85°C et concentration de CaCl2 de 0,04 M.

Par rapport à ces résultats, la présure et le coagulant microbien ont respectivement une activité coagulante de 881,41 et 55,56 UP, une force coagulante de 79327 et 5000, et une activité protéolytique estimée de 6,665 et 100µg/ml/min équivalent tyrosine/ml/ min. Les conditions optimales se sont révélées être un pH de 5,5 et 5,5, une température de 70°C et 55°C et une concentration de CaCl2 de 0,03 et 0,04 M.

Ces résultats démontrent que la ficine a une activité coagulante comparable à celle de la présure et du coagulant microbien, soulignant son utilisation potentielle dans l'industrie fromagère.

Mot clé : Ficus carica, ficine, agent coagulant, présure,coagulation du lait.

الغرض من هذه الدراسة المقارنة هو تقييم إمكانية استبدال المستخلصات الإنزيمية التجارية التي تم الحصول عليها من المصادر الميكروبية والحيوانية بواسطة الفيسين المستخرجة من اللاتكس لشجرة التين Ficus carica L.

تميز الفيسينالذي تمت دراسته بتحديد نشاطه التخثري وقوته التخثرية ونشاطه التحليلي للبروتين على الحليب المعاد تشكيله. بالإضافة إلى ذلك، تم تحديد تأثير بعض المعايير الفيزيائية والكيميائية مثل درجة الحرارة وpH والتركيز CaCl2 على فعالية التخثر. تمت مقارنة نتائج الفيسينبنشاط تخثر البريزير التجارية ومخثر الميكروبات.

تظهر نتائج هذا العمل أن مستخلص الفيسينالخام له نشاط تخثر يبلغ 372,02 UP، وقوة تخثر تبلغ 33482، ونشاط تحلل البروتين يقدر بـ 1422 غرام/مل/دقيقة مكافئ التيروزين/مل/دقيقة مع ظروف درجة الحموضة المثلى 5، 5، 85 درجة مئوية و0.04M

بالمقارنة مع هذه النتائج، فإن مخثر الميكروبي ومخثرالبريزير لهما على التوالي نشاط تخثر قدره 881.41 و55.56 UP، وقوة تخثر تبلغ 79327 و5000، ونشاط تحلل البروتين يقدر بـ 6,665و100 µ جرام/مل/مين تيروزين مكافئ/مل/دقيقة. ووجد أن الظروف المثلى هي 5.5 وpH5.5 ، ودرجة الحرارة 70 درجة مئوية و55 درجة مئوية، والتركيز 0.03 CaCl2 و0.04 M.

تظهر هذه النتائج أن الفيسين له نشاط خثري مماثل لنشاط البريزير ومخثر ميكروبي، مما يسلط الضوء على استخدامه المحتمل في صناعة الجبن.

الكلمات الرئيسية: Ficus carica، الفيسين، عامل التخثر، البريزير، تخثر الحليب.