

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Alimentaires
Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire



Réf:.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Recherche et caractérisation d'un succédané de la
présure d'origine animale (poisson) et essai d'élaboration
d'un fromage frais enrichi à base d'épices.**

Présenté par :
MR. ARROUDJ Yanis
MR. AZIBI Samy

Soutenu le : **26/06/2023**

Devant le jury composé de :

Mme BERKATI S.
MR. BOUKHALFA F.
Mlle. MEKHOUKHE A.

MAA
MCA
MCA

Présidente
Encadrant
Examinatrice

Année universitaire : 2022 / 2023

Remerciement

Avant tous, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant qui nous a donné les ailes du savoir, le courage, la patience et la volonté pour poursuivre nos études et pouvoir accomplir ce modeste travail.

Nous exprimons toute notre profonde reconnaissance et nos sincères remerciements à notre promoteur Mr. BOUKHALFA FARID chef de département microbiologie, maitre de conférence de classe A- Université de Béjaïa de nous avoir confié ce sujet de recherche, pour ses précieux conseils, ses remarques pertinentes ainsi que son encouragement et son orientation. Nous le remercions également pour sa compréhension, sa responsabilité et sa disponibilité tout au long de ce travail, pour son savoir qui nous a bien transmit durant son enseignement.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à Mme. BERKATI SALIMA Maitre de conférences A de l'université de Béjaïa pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'être président du jury.

Nous adressons également nos respectueux remerciements à Mme MEKHOUKHE AIDA Maitre de conférences à de l'université de Béjaïa d'avoir acceptée de faire partie de ce jury, nous sommes très reconnaissantes pour le temps qu'elle a consacré à examiner et évaluer ce travail.

Notre profonde gratitude a Mme DIB SALIMA d'avoir acceptée de nous accueillir au sein du laboratoire de Technologie Alimentaire et de nous avoir orienté afin d'accomplir le stage pratique de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également à tous les enseignants de notre département pour le savoir qui nous ont transmis durant notre cursus universitaire et leur contribution à notre formation.

Dédicace

Je dédie ce travail à la prunelle de mes yeux , à celle qui ma donner la vie, à la source de tendresse, de courage, de patience et de générosité, ma tendre maman celle qui a œuvré pour ma réussite de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, sa prière et sa bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A mon cher père qui est mon phare dans l'obscurité, le symbole de la bonté par excellence, l'exemple de dévouement qui n'a jamais cessé de m'encourager durant toute sa vie, aucune dédicace ne serait assez éloquente pour exprimer l'amour, l'estime, le respect que j'ai pour toi. Ce travail est le fruit de tous tes sacrifices de toute ta vie que tu à consentis pour mon éducation, ma formation et pour ne jamais manquer de rien.

A mes chère Sœur « Wissem » et « Narimane » pour leur soutien, encouragement et dévouement, qu'elles trouvent ici les sentiments de mon amour et mon affection, les mots ne sont pas assez puissants pour l'exprimer, je vous souhaite également un avenir gracieux, plein de joie, bonheur. Merci pour tout ce que vous avez fais pour moi.

A mes proches Amis : Amir, Youdes, Mecipsa, Amine et Salim pour leurs encouragement et leurs assistance.

YANIS.

Dédicace

Je dédie ce travail à la prunelle de mes yeux , à celle qui ma donner la vie, à la source de tendresse, de courage, de patience et de générosité, ma tendre maman celle qui a œuvré pour ma réussite de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, sa prière et sa bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A la mémoire de mon père qui était mon phare dans l'obscurité, le symbole de la bonté par excellence, l'exemple de dévouement qui n'a jamais cessé de m'encourager durant toute sa vie, aucune dédicace ne serait assez éloquente pour exprimer l'amour, l'estime, le respect que j'ai pour toi. Ce travail est le fruit de tous tes sacrifices de toute ta vie que tu à consentis pour mon éducation, ma formation et pour ne jamais manquer de rien.

A mon cher frère « YANIS », qui m'a dirigé, conseillé durant tout mon parcours j'ai trouvé en lui mon compagnon dans les moments les plus délicats de cette vie, les mots ne suffisent guère pour exprimer le respect, l'amour. Merci pour ta générosité, ton soutien moral, ton encouragement et pour tout le sacrifice que tu as fait pour moi. Une pensée à ton épouse « ANAIS » et à l'ange de nos vies, à la lumière qui éclaire nos journées « NELYA » je vous souhaite une vie pleine de joie, amour et sérénité.

A ma très chère Sœur « YASMINE » en qui j'ai trouvé une amie fidèle, pour son soutien et son encouragement et son dévouement, qu'elle trouve ici les sentiments de mon amour et mon affection les mots ne sont pas assez puissants pour l'exprimer, je te souhaite également un avenir gracieux, plein de joie, bonheur et amour. Merci pour tout ce que tu a fais pour moi.

A mes proches Amis : Redha, Mehdi, Souheil, Amine, Midou et Zoubir pour leurs encouragement et leurs assistance.

A ma très chère et tendre Lyna, ma muse, merci pour ta patience, ton dévouement. Je nous souhaite à tout les deux une vie gracieuse, pleine de joie, d'amour, de succès et de bonheur.

SAMY.

Liste des abréviations :

AFNOR : Association française de normalisation

BSA : Bovin Sérum Albumine

FIL : Fédération Internationale du Lait

MG : Matière Grasse

ONS : Office national des statistiques

TCA: Tri Chloroacetic Acid

MAT : Matières azotées totales

EST : Extrait Sec Total

US : Unité Soxhlet

Liste des tableaux

Numéro tableau	Titre du tableau	Numéro de page
Tableau I	Composition globale du lait de différents mammifères	03
Tableau II	Résultats de l'activité protéolytique des extraits bruts étudiés	23
Tableau III	Caractéristiques physicochimiques des deux extraits enzymatiques étudiés	24

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre	Numéro de page
Figure 01	Micelle de caséine	05
Figure 02	Les deux modèles proposés pour la structure de la micelle de caséine	06
Figure 03	Schéma représentatif du modèle de formation des micelles.	06
Figure 04	Photographie de viscères de <i>Sardina Pilchardus</i> et de <i>Dasyatis Pastinaca</i> .	14
Figure 05	Photographie de l'extrait enzymatique brut de <i>Dasyatis Pastinaca</i>	15
Figure 06	photographie du résultat de l'évaluation de l'activité coagulante	17
Figure 07	Photographie des échantillons après étuvage	20
Figure 08	Photographie du caillé récupéré	20
Figure 09	Photographie du lactosérum récupéré	21
Figure 10	photographie de l'exposition des trois échantillons de fromage	22
Figure 11	Présentation graphique de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés	26
Figure 12	Présentation graphique de la variation de l'activité coagulante en fonction du pH	28
Figure 13	Présentation graphique représentant l'effet de la variation de la concentration en chlorure de calcium sur l'activité coagulante	29
Figure 14	Présentation graphique représentant l'effet de la variation de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante	31
Figure 15	Présentation des fromages obtenus	32
Figure 16	Photographie du fromage élaboré avec de la présure après assaisonnement	33
Figure 17	Représentation graphique de l'analyse sensorielle	34
Figure 18	Présentation graphique de la préférence des dégustateurs	36

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction..... 1

Partie théorique

I. Généralités 3

1) Lait 3

2) Composition du lait..... 3

II. Coagulation du lait 7

1) Type de coagulation 7

a. Coagulation acide..... 7

b. Coagulation enzymatique 7

c. Coagulation mixte 8

2) Paramètres influençant la coagulation 8

a. Influence du potentiel d'hydrogène 8

b. Influence de la température sur la coagulation du lait 9

c. Influence de la concentration en chlorure de calcium..... 9

d. Influence de la concentration en enzyme 9

3) Enzymes coagulantes 9

a. Chymosine 9

b. Pepsine..... 10

c. Trypsine..... 10

III. Présure et succédanés.....	11
1) Présure.....	11
2) Succédanés de la présure.....	11
a. Succédanés de la présure d'origine animale.....	12
b. Succédanés de la présure d'origine végétale.....	13
c. Succédanés de la présure d'origine microbienne.....	13

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

I. Produits chimiques	14
II. Matériels animal	14
1) Extraction et préparation de l'extrait enzymatique.....	15
III. Caractérisation physico-chimique de l'extrait brut de <i>Sardina Pilchardus</i> et de <i>Dasyatis Pastinaca</i>	15
1) Evaluation de l'activité protéolytique	16
2) Evaluation de l'activité coagulante.....	17
3) Mesure de la teneur en protéine des extraits enzymatiques	18
IV. Etude des paramètres influençant l'activité enzymatique.....	18
1) Effet de la concentration de chlorure de calcium sur l'activité coagulante	18
2) Effet de la variation de pH sur l'activité protéolytique.....	18
3) Effet de la température sur l'activité coagulante	19
4) Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante.....	19
V. Elaboration du fromage frais par l'extrait enzymatique de <i>Sardina Pilchardus</i> et de <i>Dasyatis Pastinaca</i> et de la présure	19
VI. Analyse sensorielle des fromages.....	21

Résultats et discussions

I. Caractérisation physico-chimique des extraits bruts.....	23
II. Etude des paramètres influençant l'activité enzymatique des extraits bruts	25
1) Influence de la température sur l'activité coagulante	25
2) Influence de la variation du pH sur l'activité protéolytique.....	27
3) Influence de la concentration en chlorure de calcium sur l'activité coagulante.....	29
4) Influence de la concentration en extrait enzymatique sur l'activité coagulante.....	31
III. Elaboration du fromage.....	32
IV. Analyse sensorielle	34
Conclusion	37
Référence bibliographique	39
Annexe	48
Résumé	

Introduction

Le lait est considéré comme étant le produit noble et la base de l'alimentation de tous les mammifères, y compris l'Homme. En plus de ses valeurs nutritionnelles élevées, il est également considéré comme un aliment à part entière, mais sa consommation et sa production a souvent été limitée en raison de son instabilité, l'irrégularité de production ainsi que sa grande fragilité. Ceci a conduit les agents actifs dans le domaine de l'agro-alimentaire à rechercher d'autres formes de conservation de ses qualités nutritionnelles permettant également la prolongation de sa disponibilité dans le temps, ce qui a conduit à l'apparition de divers produits laitiers notamment le fromage (**Jeantet *et al*, 2017a**).

Le fromage est apparu peu de temps après la domestication et élevage des animaux, enfaite, à l'origine, on recherchait un moyen de conservation des principaux constituants du lait, c'est à partir de là que l'on a découvert la transformation du lait en fromage qui est considéré comme étant, aujourd'hui, un aliment ayant des qualités nutritionnelles incontestables. (**Jeantet *et al*, 2017b**)

La production fromagère, repose principalement sur la coagulation du lait vers un caillé, ou la présure est majoritairement utilisée. Cette dernière, est une enzyme protéolytique extraite à partir de l'estomac des jeunes ruminants. L'action de cette enzyme repose essentiellement sur la dissolution de l'état micellaire des caséines du lait, provoquant ainsi la séparation du lactosérum, et la formation d'un caillé. (**Génin, 1968; Nouani *et al*, 2009**).

Il existe trois types de coagulation ; une coagulation par acidification qui transforme le lactose contenu dans le lait en acide lactique, une coagulation enzymatique en utilisant une enzyme appelée la présure ou l'un de ses succédanés, et une coagulation mixte qui se base sur la combinaison des deux méthodes précédentes. (**Boughellout, 2007**).

La présure de veau est l'agent coagulant le plus utilisé, qui est extrait à partir de la caillette de veau non sevré, comprenant majoritairement de la chymosine et minoritairement la pepsine (**Desmazeaud, 1997**).

La disponibilité de la présure est restreinte par rapport à la demande croissante des industries laitières. En effet, l'obtention de coagulants naturels du lait s'avère un véritable défi car cet agent coagulant d'origine animale qui est la présure de veau, n'a pas été en mesure de répondre à la demande excessive du marché.

Ces enzymes d'origine animale sont non seulement excessivement chers, mais aussi leur consommation a été limitée en raison de contraintes religieuses ou alimentaires, ce qui a conduit à la recherche de nouvelles protéases ayant des propriétés coagulantes similaires à celles de la présure. **(Boumediene, 2021).**

Les végétaux ont été les premiers à faire objet de recherche dont le but est l'isolement de leurs enzymes coagulantes. **(Boumediene, 2021).** Ces enzymes sont extraites à partir de différentes parties des plantes supérieures (fleurs, feuilles et tiges du chardon) **(Slamani, 2018).**

D'autres succédanés de cette enzyme ont fait l'objet de recherches telles que les protéases d'origine fongique ou bactérienne synthétisées par diverses espèces.

Il existe également des succédanés de présure d'origines animales telles que les pepsines porcines, bovines et les pepsines extraites des pro-ventricules des volailles **(Siar, 2014).**

Selon l'Office National des Statistiques **(Anonyme 1)**, la production de l'industrie fromagère en Algérie est passée de 20 milles tonnes en 2006 à 30 milles tonnes en 2011, avec une consommation moyenne de 0,6 Kg/habitant/an en 2006 à 0,7 Kg/habitant/an.

C'est dans cette vision que l'on a tracé l'objectif de cette étude qui est la valorisation des sous produits des espèces marines et la recherches de succédanés de présure d'origine animale.

Synthèse bibliographique

I. Généralités

1) Lait

Il est défini par le Congrès International pour la Répression des Fraudes Alimentaires (CIRFA), tenu à Genève en 1908 comme étant « le produit intégral de la traite totale et ininterrompu d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum » (**Bourjois et Larpent, 1981**).

Le lait est un milieu multiphasique, de couleur blanchâtre, il est constitué d'une phase aqueuse qui contient majoritairement du lactose et des éléments minéraux, et une phase contenant des éléments lipidiques (globules gras) et d'autres éléments de natures protéiques telles que les micelles de caséines. Ces propriétés nutritionnelles et technologiques dépendent essentiellement des caractéristiques physico-chimiques de chacune de ses phases. (**Jeantet et al, 2000**).

2) Composition du lait

La composition du lait varie en fonction de la race, période de lactation, nature de l'alimentation, saison de récolte ainsi que l'âge de l'animal (**Amiot et al, 2002**).

Tableau I : Composition globale du lait de différents mammifères en g/100.g⁻¹ de lait (**Jeantet et al, 2008**)

Lait	EST	MAT	Protéines	Caséines	Urée	MG	Lactose	Cendres
Vache	13	3.9	3.2	2.8	0.014	3.9	4.9 (4 - 6)	0.9
Brebis	18.4	15.7	5.5	4.5	0.035	7.19	4.7	0.9
Chèvres	-	3.1	2.8	2.3	0.0385	3.38	4.4 – 4.7	0.5- 0.8

EST : extrait sec totale. **MAT :** matières azotées totales. **MG :** matière grasse.

Le lactose est un disaccharide constitué d'une unité de galactose et d'une unité de glucose, sa synthèse s'effectue dans les cellules lactogènes à partir du glucose sanguin en présence de galactosyl-transférase et d' α -lactalbumine. Il représente environ 97% des glucides totaux du lait de vache. (**Jeantet et al, 2008**)

Il correspond au constituant majeur de la matière sèche du lait, représentant plus de la moitié de l'extrait sec total (EST).

Toutefois, sa concentration est relativement constante et elle est peu affectée par les variations saisonnières. Il a un pouvoir sucrant faible, et joue un rôle dans l'élaboration du système nerveux. (**Mahaut et al, 2000**).

La matière grasse représente à elle seule la moitié de l'apport énergétique du lait, Elle est majoritairement représentée par des triacylglycerols (environ 97.5% des lipides totaux), ces derniers sont responsables des propriétés rhéologique et physique de la matière grasse laitière. (**Croguennec et al, 2020**).

La consommation de la matière grasse laitière est indispensable dans l'alimentation, ces lipides d'origine laitière ne soulèvent pas d'objection particulière sur le plan nutritionnel et sont une source de vitamine liposoluble (A, D et E) (**Jeantet et al, 2008**).

Les minéraux, représentés majoritairement par le calcium, potassium, et chlore constituent une fraction mineure (moins de 7%) de la matière sèche (**Croguennec et al, 2020**). Ils jouent un rôle structural et fonctionnel, et sont souvent impliqué dans des mécanismes physiologiques (régulation nerveuse, contraction musculaire etc.) (**Jeantet et al, 2008**).

La teneur du lait en macroéléments et oligo-éléments varient selon l'espèce, race et stade lactation. (**Jeantet et al, 2008**).

Les protéines du lait représentent un important apport protéique dans les rations alimentaires, ces protéines ont plusieurs rôles, tel que : rôle nutritionnel, physiologiques et fonctionnel. (**Croguennec et al, 2020**).

Les protéines se distinguent par différentes structures et propriétés physico-chimiques, elles sont classées en deux types en fonction de leur solubilité dans l'eau ainsi que leur stabilité. (**Amiot et al, 2002**). On distingue : les protéines solubles appelée protéines sériques, et les protéines coagulables nommées les caséines (α_1 , α_2 , β , κ). (**Croguennec et al, 2020**).

La caséine est la protéine principale du lait de vache, elle représente environ 80% des protéines totales et les 20% restantes sont des protéines du sérum. (**Dussault-Chouinard, 2019**)

Selon **Schmidt (1982)**, ces caséines sont sous forme de particules colloïdales nommées micelles de caséine présentes dans le lait.

Dans le lait, la structure des caséines est peu ordonnée, et elles ont une forme sphérique, dont le diamètre moyen se situe entre 150-200 nm. La micelle est composée de 92% de caséines à différentes proportions et de 8% de minéraux. La proportion des caséines α s est le plus souvent constante, tandis que, le rapport caséine κ /caséine β est inversement proportionnelle à la taille des micelles. Quant à la fraction minérale elle est composée à 90% de phosphate de calcium connu sous forme colloïdale et a 10% d'ions magnésium et citrate (**Slamani, 2019**).

Les micelles sont composées d'un cœur hydrophobe, de nature apolaires et une enveloppe hydrophile de nature polaire, (**Meitton *et al*, 1994**).

Quant aux modèles de structure micellaire décrits, il en existe deux types : le premier, est un modèle à sous-unités qui met en avant les structures sub-micellaires des caséines et le deuxième est un modèle à nano-clusters qui décrit une organisation sous forme d'amas de phosphate de calcium inorganique.

Ces deux modèles sont opposés, néanmoins, ils se rejoignent sur la position de la caséine K, qui se trouve à la surface de la micelle dont les chaînes C-terminales assurent la stabilité de la micelle (**Slamani, 2018**).

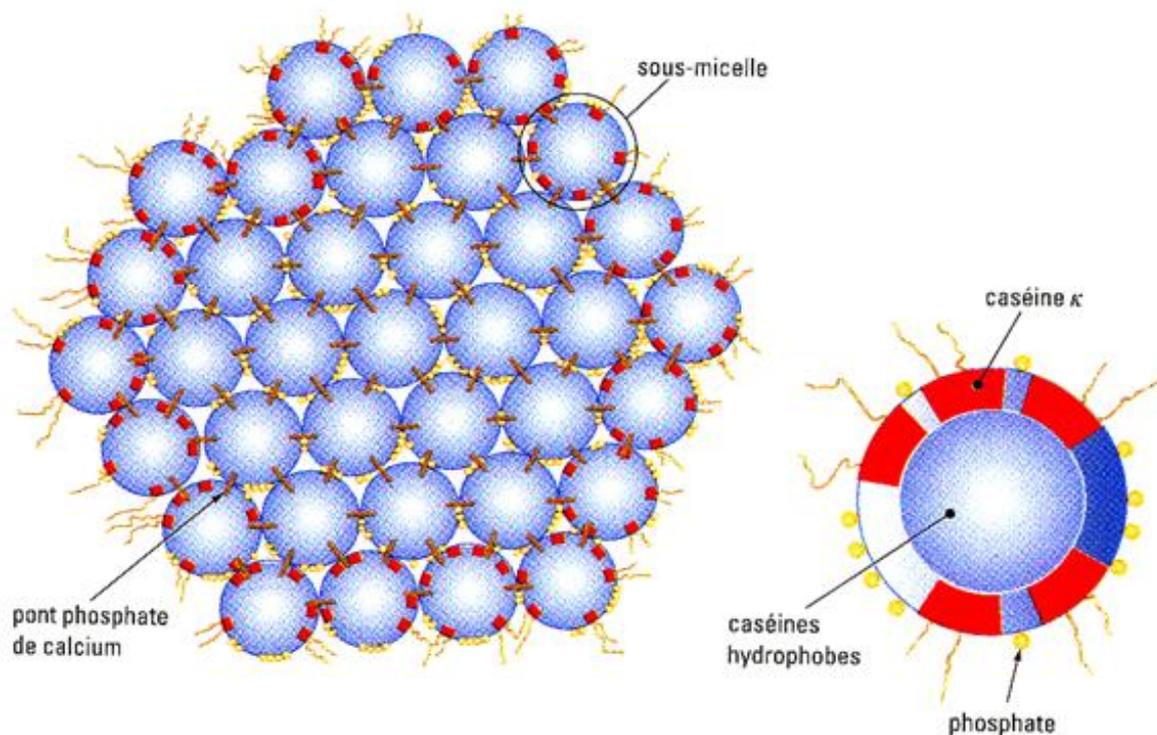


Figure 1 : Micelle de caséine

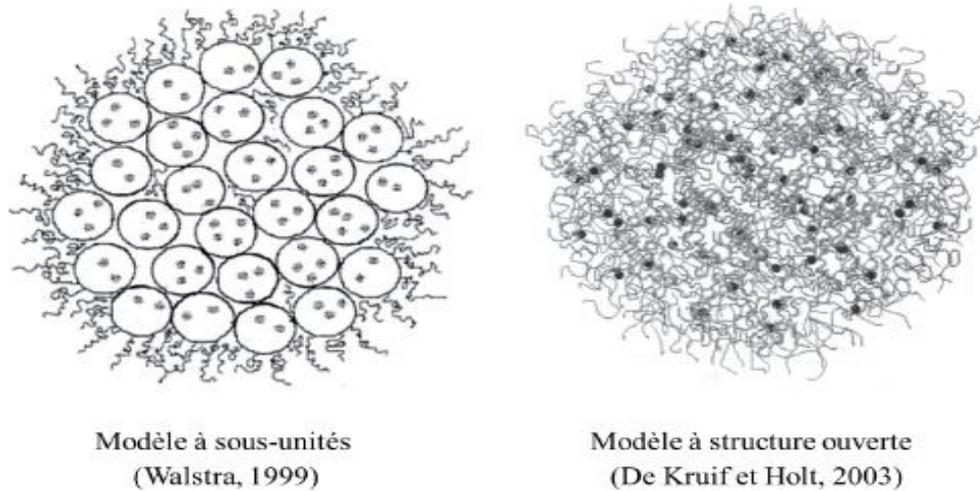


Figure 2 : Modèles proposés pour la structure de la micelle de caséine.

Selon le modèle de **Shmidt (1980)**, complété par **Walstra (1999)**, la micelle est constituée d'un ensemble de submicelles, qui sont de nature protéique et sont variables dans la composition, ces dernières sont associées entre elles par un pont phosphocalcique. (**Slamani, 2018**).

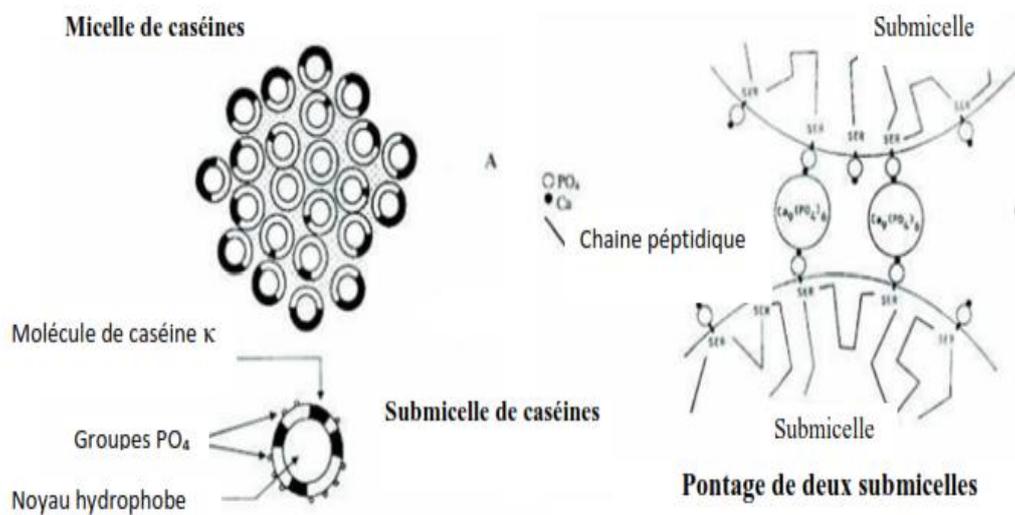


Figure 3 : Schéma représentatif du modèle de formation des micelles selon **Schmidt(1980)**.

II. Coagulation du lait

La coagulation peut être définie comme étant un processus physico-chimique qui se produit lorsque les micelles de caséine subissent des changements sous l'effet d'enzymes protéolytiques et/ou d'acide lactique (**Eck, 1987**). C'est un changement irréversible de l'état liquide du lait vers un état semi-solide induisant à la formation d'un coagulum ou gel (**Jeantet et al, 2017a**).

1) Type de coagulation

La coagulation du lait peut être induite par l'action d'enzymes (présure), ou par acidification. (**Lucey, 2002**).

a. Coagulation acide

La coagulation acide du lait est à la base d'une grande diversification de produits laitiers. (**Lucey, 2016**), L'acidification du lait se fait par des ferments lactiques ou par l'addition d'acides organiques ou minéraux (**Jeantet et al, 2017b**).

Cette acidification a un impact direct sur la stabilité des micelles de caséine, en réduisant leur charge, en dissolvant certaines des liaisons transversales insolubles du phosphate de calcium et en modifiant la liaison interne entre les protéines. (**Lucey, 2016**).

En cas d'acidification rapide par l'utilisation d'un acide (organique ou minérale), cela entraîne la formation d'un gel plus ou moins granuleux dispersé dans le lactosérum, en revanche la formation d'un gel lisse homogène est due à une acidification progressive suite à une fermentation lactique ou par hydrolyse de glucono-o-lactone en acide gluconique (**Jeantet et al, 2017a**).

b. Coagulation enzymatique

C'est la transformation de l'état liquide du lait à l'état semi-solide par action d'enzymes protéolytiques, La présure d'origine animale constituée principalement de la chymosine et d'un peu de pepsine est l'enzyme la plus utilisée (**Jeantet et al, 2017a**)

Le mécanisme d'action des enzymes coagulantes lors de la coagulation du lait est bien établi. Il comporte deux phases (**Slamani, 2018**).

Une phase primaire dite enzymatique qui correspond à la réaction d'hydrolyse de la fraction caséine κ au niveau de la liaison peptidique Phenylalanine¹⁰⁵-Méthionine¹⁰⁶. Cette

réaction induit à la libération du caséinomacropéptide qui est la partie 106-169 à caractère hydrophile, chargée négativement et responsable des répulsions électrostatiques. La partie qui reste intégrée à la micelle (1-105), c'est la partie N-terminal à caractère hydrophobe désignée paracaséine- κ . La perte du pôle le plus hydraté des micelles induit une diminution importante de la charge nette négative des micelles réduisant ainsi les répulsions électrostatiques (**Slamani, 2018**). En raison de la perte de forces de répulsion, les micelles de caséine s'agrègent ensuite et commencent à former un réseau de caillé tridimensionnel.

La phase secondaire, dite d'agglomération, se caractérise par l'agrégation puis la réticulation des micelles déstabilisées qui ont perdu leur capacité de répulsion à la suite de la scission de la partie hydrophile de la caséine κ . Cette phase d'agglomération débute lorsqu'au moins 80% de la caséine κ est hydrolysée. Les paracaséines vont se lier entre elles par des liaisons hydrophobes, ce qui crée la coagulation (**Slamani, 2018**)

c. Coagulation mixte

La coagulation mixte est le résultat d'une action conjuguée des enzymes protéolytiques et l'acidification du lait (**Mahaut et al, 2000**)

Les gels formés suite à cette coagulation, ont des caractéristiques similaires à la fois, à ceux du gel obtenu par voie acide et celle du gel obtenu par voie enzymatique (**Amimour, 2019**).

2) Paramètres influençant la coagulation

La coagulation du lait est influencée par plusieurs paramètres, dont les plus importants sont la variation du potentiel d'hydrogène (pH), la concentration en chlorure de calcium, la température mais aussi par la concentration des enzymes coagulantes. (**Larsson et Andren, 1999; Anema et al, 2005**).

a. Influence du potentiel d'hydrogène

Le potentiel d'hydrogène est un facteur important pour la coagulation du lait. Il affecte le temps de coagulation ainsi que la vitesse de raffermissement en gel et la fermeté maximale. La coagulation est plus rapide, le gel est plus ferme et la fermeté est plus élevée lorsque le pH est compris entre 6,0 et 6,7 (**Remeuf et al, 1991**).

b. Influence de la température sur la coagulation du lait

La température est également un facteur essentiel dans le processus de coagulation car lorsque la température est trop basse, cela provoque la solubilisation du phosphate de calcium des micelles de caséine, ce qui induit à un ralentissement du temps de coagulation (**Allogie et al, 2000; Najera et al, 2003; Anema et al, 2005**). Or, lorsque la température est plus élevée après chauffage, (entre 40 et 42°C) la coagulation augmente progressivement puis diminue par la suite, arrivée à 65°C il n'y a plus de coagulation car l'enzyme est dénaturée.

c. Influence de la concentration en chlorure de calcium

La teneur en calcium influence également le temps de coagulation ainsi la fermeté du gel, de manière à ce que, lorsque le rapport calcium/ (phosphate+citrate) de la phase aqueuse augmente, la vitesse de coagulation augmente. Or, lorsque le rapport cité est faible, la vitesse de coagulation devient faible également (**Remeuf et al,1991**).

d. Influence de la concentration en Enzyme

Concernant la concentration en enzyme, elle influence la coagulation telle que le temps de coagulation est inversement proportionnelle à la vitesse de coagulation. La concentration en enzyme influe sur la vitesse d'agrégation des micelles mais également sur les caractères rhéologiques du gel formé, notamment sur sa vitesse de raffermissement (**Eck, 1987**).

3) Enzymes coagulantes

a. Chymosine

C'est une enzyme sécrétée par la caillette des jeunes ruminants non sevrés. Tout d'abord sous forme inactive appelée la pro-chymosine qui est ensuite transformée par un processus auto-catalytique qui est accélérée par les ions H⁺ en forme active. (**Otani et al, 1991**).

La chymosine (EC 3.4.23.4) est une protéase à acide aspartique qui est généralement utilisée pour la coagulation du lait pour la production fromagère. Son mode d'action repose sur l'hydrolyse de la liaison Phe105–Met106 de la caséine κ (**Drohse et Fortran, 1989; Roseiro et al, 2003**). En secteur fromager, la chymosine produit moins de protéolyse et donc moins de composés amers (**Bouyoucef et al, 2016**).

b. Pepsine

Cette enzyme est sécrétée par la caillette des ruminants après le sevrage. La pepsine (EC 3.4.23.1) est une protéase très acide efficace pour rompre les liaisons peptidique entre les acides aminés peptidique ainsi que les acides aminés aromatiques. (**Ernstorm et Wong, 1983 ; Barbano et Rasmussen, 1992**). Elle est utilisée pour la coagulation du lait et une dose excessive peut entraîner des défauts de goûts (**Blum *et al*, 1985**).

c. Trypsine

Cette protéase dégrade les protéines en peptides, conduisant à la libération de fragments peptidiques d'acides aminés basiques. Elle agit principalement sur le groupe carboxylique des chaînes peptidiques des acides aminés Lysine et Arginine. Dans la production fromagère, son utilisation reste limitée à cause de son entraînement d'un goût amer. (**Rao, Tanksale *et al*, 1998**).

III. Présure et succédanés

1) Présure

La présure telle qu'elle est définie par la fédération internationale du lait (FIL), c'est l'extrait possédant le pouvoir coagulant ou de coagulation, provenant des caillettes de jeunes ruminants abattus avant sevrage. (**Ramet, 1985; Andren, 2002**).

La présure est un mélange d'enzymes protéolytiques et lipolytiques tel que la chymosine, la pepsine et la lipase. Son activité est donc indispensable pour aboutir à la coagulation enzymatique du lait. Elle est responsable de la dégradation des caséines du lait par rupture des liaisons peptidiques covalentes de la caséine-K formée entre la phénylalanine et la méthionine. (**Selin et al, 2018**).

Aujourd'hui, plus de 90% de la présure utilisée pour la production fromagère, est une chymosine produite par fermentation. (**Amira et al, 2017**).

Depuis quelques années de nombreux facteurs ont favorisé les recherches de succédanés de la présure en vue de la fabrication du fromage. Parmi ces facteurs, il faut citer le prix relativement élevé des préparations commerciales de présure et certaines difficultés d'approvisionnement, les variations importantes de prix de cette matière première et ses variations de qualité (**Génin., 1968**). Mais aussi en raison de la forte augmentation de la demande mondiale en fromage, la demande en présure commence à dépasser l'offre disponible. Il faut citer également le facteur « religion », tout cela a induit à la recherche et l'identification d'enzymes dites remplaçantes dès le début des années 1960 selon (**Jaros et Rhom, 2017**).

2) Succédanés de la présure

Suite à une pénurie de présure causée par une baisse de l'offre liée au marché des caillettes de jeunes bovins, des recherches ont été intensifiées pour trouver des enzymes coagulantes du lait qui pourraient être utilisées en remplacement de la présure pour la fabrication du fromage. (**Slamani, 2018**)

Les coagulants microbiens et végétaux suscitent un intérêt croissant en raison de facteurs tels que le végétarisme et les convictions religieuses. L'utilisation des protéases végétales présente l'avantage d'être une source riche en molécules bioactives, contrairement à la présure ou aux enzymes dérivées d'OGM/OVM d'origine animale. (**Shrestha et Maskey,**

2020). Pour cela, différentes enzymes protéolytiques d'origine microbienne, végétale, et animale ont été utilisées (**Boumediene, 2021**).

a. Succédanés de la présure d'origine animale

Actuellement, les enzymes coagulantes d'origine animales sont principalement prélevées dans la caillette des ruminants (ex. : renne) et des animaux monogastriques (exemple : le lapin). Les remplacements de la présure animale doivent agir de manière similaire à des pH et températures spécifiques, avoir une forte capacité à coaguler la caséine κ tout en limitant leur activité protéolytique globale, et être aussi résistants à la chaleur que la présure naturelle. (**Paul et al, 2017**).

Les abats de poisson sont une source potentielle de plusieurs produits de haute qualité tels que de protéines (58 %), d'acides organiques, d'acides aminés, d'acides gras essentiels et de plusieurs enzymes (**Thirukumaran et al, 2022**).

Il a été rapporté que certains crustacés et animaux aquatiques (par ex, *Munida*, calmar, phoque, thon et poisson-chat de mer) peuvent être utilisés pour produire des enzymes remplaçantes de la présure, ou enzymes coagulantes (**Rossano et al, 2011**).

Pepsine des espèces marines

La pepsine est présente chez de nombreuses espèces marines, c'est l'une des principales protéases gastriques présentes dans les viscères des poissons, elle est représentée comme étant la protéase majoritaire (**Klomklao et al, 2007; Balti, 2011**).

Elle possède une forte activité sur les acides aminés aromatiques tels que Phénylalanine, tyrosine et Tryptophane et une faible activité sur les peptides à courte chaîne (**Zhao et al, 2011**).

La pepsine est sécrétée sous forme de zymogène dite forme inactive (Pepsinogène), puis activée par l'acidité de l'estomac (**Klomklao, 2008; Sholeh et al, 2019**). Son activité est très dépendante des valeurs du pH, des températures et du type et concentration du substrat, elle est caractérisée également par une activité considérable sur l'hémoglobine (**Balti, 2011 ; Zhao et al, 2011**).

b. Succédanés d'origine végétale

La capacité de certains végétaux à coaguler le lait est dû à la présence d'une enzyme dont les caractères semblent être similaires aux enzymes coagulantes retrouvés généralement dans l'estomac des mammifères. Cette enzyme est assez répandue dans le règne végétal ainsi que chez les êtres inférieurs. On la retrouve dans les composés des crucifères, les plantes carnivores, les algues brunes, etc. (**Christen et Virasoro, 2017**)

Cependant, les recherches ont démontré que l'agent coagulant des végétaux se caractérise par une activité protéolytique excessive ce qui entraîne l'apparition d'un goût amer du fromage C'est donc pour cela que l'utilisation de ces protéases coagulantes reste limitée (**Eck, 1987**).

c. Succédanés d'origine microbienne

Plusieurs études sont portées sur de multiples espèces de bactéries notamment dans les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* tels que *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*. Les résultats obtenus sont qualifiés comme étant décevants ou insuffisants en raison de leurs activités protéolytiques qui sont généralement très élevées par rapport à celles de la présure. (**Ramet, 1997**). Cela peut engendrer une perte en protéine, rendement faible mais également la génération de saveur désagréable (**Harboe et al, 2010**).

Des études comparatives ont indiqué que ces enzymes coagulantes et la chymosine sont similaires dans le mécanisme de coagulation, et plusieurs types de fromages sont préparés à partir de ces extraits sont similaire à ceux obtenus par une coagulation avec la présure traditionnelle (**Nouani, 2009**).

Selon (**Jacob et al, 2011**), l'enzyme de *Rhizomucor miehei* est le coagulant le plus utilisé dans la production fromagère.

Matériels et méthodes

I. Produits chimiques

Tris base 99%, acétate de sodium, acide trichloracétique, hydroxyde de sodium, acide acétique, chlorure de calcium, et L-tyrosine sont des produits de marque BIOCHEM produits au Canada.

Le bleu de comassie G-250 de marque BIOCHEM produit en France

Tartrate sodium-potassium, carbonate de sodium, sulfate de cuivre, acide phosphotungstique, acide chlorhydrique, acide phosphomolybdique, acide sulfurique, méthanol, acide phosphorique sont de marque BIOCHEM, produit en Grande Bretagne.

II. Matériel animal

Afin de mener à bien notre étude, six échantillons de règne animal (poisson) ont été sélectionnés en tenant compte des recherches bibliographiques effectués à savoir : *Balistes Capriscus*, *Dasyatis Pastinaca*, *Sardina Pilchardus*, *Mullus*, *Solea Solea* et *Boops Boops*.

La récolte des viscères fraîche des poissons a été réalisée au niveau des différentes poissonneries de la commune de Béjaïa en mois de mai 2023.

Les viscères ont été nettoyés et vidé avec de l'eau afin de récupérer le matériel digestif des deux poissons, le matériel digestif récupéré est ensuite conserver au congélateur pour 24h.

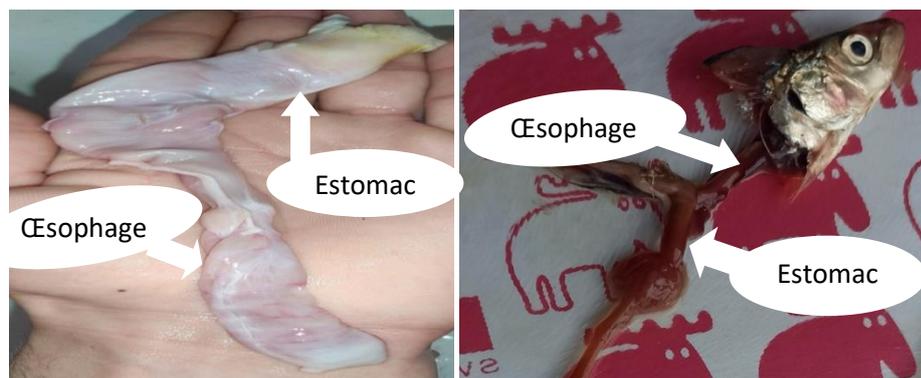


Figure 4 : Photographie de viscères de *Sardina Pilchardus* et de *Dasyatis Pastinaca*

1) Extraction et préparation de l'extrait enzymatique

L'extraction de l'extrait enzymatique a été faite selon la méthode décrite par **Barkia et al (2010)**, en homogénéisant les viscères du poisson dans un tampon Tris-HCL 10 mM à un pH 8.

Après filtration le filtrat est centrifugé à 3500rpm pendant 30 minutes à une température de 4°C.

Une fois centrifugé, le surnageant récupéré qui représente l'extrait enzymatique est reparti en Eppendorfs et conservé au congélateur.

Dans le but de comparer nos deux extraits bruts étudiés, des échantillons de viscère équivalent à 100 g de *Sardina Pilchardus* et 120 g de *Dasyatis Pastinaca* ont été utilisées pour effectuer une extraction selon le protocole décrit précédemment. Une fois cette opération est réalisée, deux extraits bruts des poissons ont été récupérés et sont nommés E1 et E2 désignant respectivement l'extrait enzymatique brut de *Dasyatis Pastinaca* et de *Sardina Pilchardus*



Figure 5 : Photographie de l'extrait enzymatique brut de *Dasyatis Pastinaca*

III. Caractérisation physico-chimique de l'extrait brut de *Sardina Pilchardus* et de *Dasyatis Pastinaca*

La couleur et l'aspect des extraits étudiés sont déterminés d'après la méthode décrite par **AFNOR (1981)**.

L'évaluation de l'activité enzymatique des extraits se fait par deux méthodes : la mesure de l'activité protéolytique et l'évaluation de l'activité coagulante.

1)- Evaluation de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique consiste à mesurer le taux d'hydrolyse d'un substrat qui est la caséine par l'extrait enzymatique.

L'activité protéolytique a été évaluée par la méthode de **Silva *et al* (2014)**. Cette mesure consiste à évaluer le taux d'hydrolyse d'un substrat par une enzyme en estimant la quantité des composés aminés libres et des peptides.

L'activité protéolytique de nos extraits enzymatiques a été mesurée en utilisant la caséine comme substrat. La dégradation de la caséine suite à l'hydrolyse de la liaison peptidique Phe105-Met106, cela va induire la libération d'un groupe d'acides aminés y compris la tyrosine. La mesure de l'activité protéolytique est mise en évidence par un dosage colorimétrique à 660nm des groupements tyrosiniques libérés, par un réactif dit réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de **Lowry (1951)**.

Le mélange réactionnel consiste à mélanger 0.5g de caséine dans 100mL de l'eau distillé, Un volume de 0.4 ml de ce mélange est additionné de 0.4mL d'un tampon acétate 0.02M à pH 5.5, et 0.2ml d'extrait enzymatique, qui sera ensuite bien agité et incubé au bain-marie à la température de 35°C.

Au bout de 30 minutes la réaction est arrêtée par l'addition de 1mL de TCA à 10 % puis laissée au repos pendant 15 minutes à température ambiante. L'ensemble est ensuite centrifugé. Suite à la centrifugation, 0.5mL du surnageant sont additionnés de 2.5mL de solution C.

Après une incubation de 10 minutes à 35 °C, un volume de 250 µL de réactif de **Folin-Ciocalteu** (dilué au 1/2) est ajouté. Une fois le mélange bien agité et incubé à température de 35 °C pendant 20 minutes, une coloration bleue apparaît, et l'absorbance est alors mesurée à 660 nm.

La concentration en tyrosine des tubes, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la tyrosine dans les mêmes conditions expérimentales (**Annexe V**).

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

À 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.

$$\text{Activité spécifique} = \text{activité protéolytique(ug/ml.min)}/\text{teneur en protéine}$$

2)- Evaluation de l'activité coagulante

L'activité coagulante peut être exprimée par la force coagulante (F), donnée en unité Soxhlet (US). Elle représente le nombre de volumes de lait frais coagulé par un volume d'extrait coagulant, pendant un temps de 40 minutes à 35°C.

L'activité coagulante qui est exprimé par la rapidité avec laquelle l'enzyme coagule le lait, est déterminé selon la méthode de **Silva *et al* (2014)**.

La technique consiste à prendre 5ml du mélange composé de 10% de poudre de lait écrémé (0%) et du CaCl₂ 0.01mol/L, ensuite incuber les tubes dans un bain marie a 35°C. au bout de 10 minute 500ul de l'extrait enzymatique sont ajouté au mélange.



Figure 6 : Photographie du résultat de l'évaluation de l'activité coagulante

La force coagulante est donnée par la l'équation suivante :

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

Où :

2400 : temps d'incubation (40minutes) x 60 secondes.

V : le volume du lait utilisé.

t : le temps de l'apparition des premières fluctuations.

v : volume de l'extrait enzymatique.

3)- Mesure de la teneur en protéine des extraits enzymatiques

Le dosage des protéines totales dans les extraits enzymatiques est déterminé par la méthode de **Bradford (1976)**.

Cette méthode repose de la réaction entre le bleu de Comassie G-250 et les protéines présentes dans l'extrait enzymatique. Une fois liée la couleur du mélange vire vers le bleu et la lecture spectrophotométrique se fait à 595nm.

La méthode de **Bradford (1976)** consiste à ajouter 500ul de l'extrait enzymatique à 2ml de réactif de Bradford, après agitation le mélange est incubé à l'obscurité pendant environ 20 minutes.

La mesure de la teneur en protéines se fait en se référant à une courbe d'étalonnage d'un standard qui est bovine sérum albumine (BSA) (**Annexe IV**).

IV. Etude des paramètres influençant sur l'activité enzymatique

1- Effet de la concentration de chlorure de calcium sur l'activité coagulante

L'effet de la concentration du chlorure de calcium sur l'activité coagulante a été étudié en ajoutant des différentes concentrations de chlorure de calcium (CaCl₂) (0.005M, 0.01M, 0.02M, 0.03M, 0.04M, 0.05M) à la solution de 10% de lait écrémé préparé.

2- l'effet de la variation du potentiel d'hydrogène sur l'activité protéolytique

Afin d'étudier l'effet du pH sur l'activité protéolytique, le protocole de **Silva et al (2014)** a été suivi. L'activité protéolytique a été mesurée sur différents pH (5, 5.5, 6, 6.5, 7,

7.5, 8), ensuite, les groupements tyrosine libérés après l'hydrolyse du substrat (caséine) ont été dosés par la méthode de **Lowry(1951)**.

3- L'effet de la température sur l'activité coagulante

L'influence de la température sur l'activité coagulante est étudiée en mesurant l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut des échantillons, à différentes températures et en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique, préparé dans les mêmes conditions.

Les températures du lait utilisées sont : 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, et 70°C pour l'extrait enzymatique brut des échantillons.

4- L'effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante

L'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante a été étudiée en variant la concentration du volume enzymatique (550ul, 650ul, 750ul, 850ul, 1ml).

V. Elaboration de fromage frais par l'extrait enzymatique de *Sardina Pilchardus*, *Dasyatis Pastinaca* et de la Présure

Afin d'élaborer un fromage frais en utilisant nos extraits enzymatiques comme agent coagulant, 1 litre de lait de chèvre frais a été standardisé en ajoutant 20g de poudre de lait low-heat écrémée (0% matière grasse) fournis par la SARL Laiterie SOUMMAM. Ce processus de standardisation a pour but d'augmenter le taux de matière sèche dans le lait.

A la fin de cette opération, on plonge les récipients de lait dans un bain de glace, jusqu'à température optimale d'ensemencement pour chaque extrait enzymatique, cette température est déterminée par la mesure de l'activité coagulante des extraits.

Le lait destiné pour l'ensemencement avec l'extrait de poisson est refroidi jusqu'à une température de 65°C, alors que celui ensemencé avec l'extrait de présure est refroidi jusqu'à 38°C.

L'ensemencement de chaque lait, est réalisé dans un bac, avec un volume de 15mL/L pour chaque extrait brut de poisson et 20mL/L de solution de présure, respectivement. Après ensemencement le mélange est agité pendant 10 minutes afin de bien homogénéiser le lait avec l'extrait enzymatique, puis gardé dans une étuve à 45°C pendant 12h.

Une fois coagulé, le caillé est récupéré afin de procéder à l'étape de l'égouttage qui se fait sur une toile et en exerçant une pression à la main sur la toile.



Figure 7 : Photographie des échantillons récupérés après étuvage

A : échantillon de la Présure, B : échantillon de *Sardina pilchardus*

C : échantillon de *Dasyatis Pastinaca*

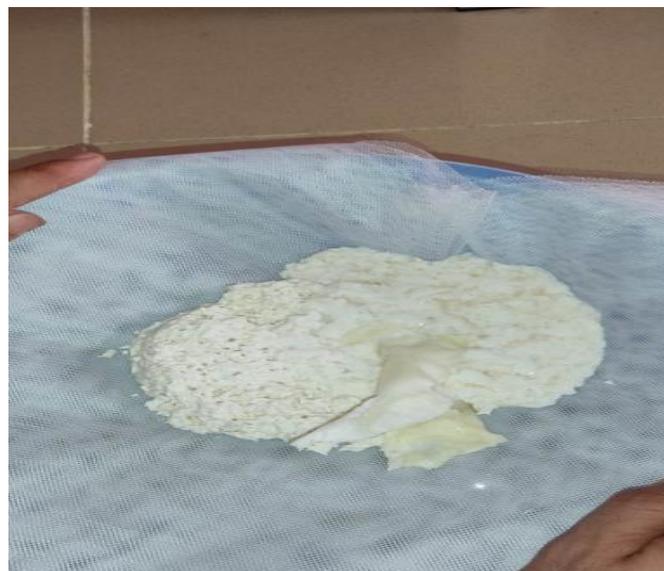


Figure 8: Photographie du caillé récupéré



Figure 9: Photographie du lactosérum récupéré

Une fois le fromage est prêt, il a été assaisonné avec de la poudre de l'ail sèche et des herbes de province afin de masquer l'amertume causé par les deux extraits enzymatiques du poisson, puis le fromage a été gardé au frais pendant 12h.

VI. Analyse sensorielle des fromages

La réalisation de l'analyse sensorielle a pour but de comparer entre les trois fromages : le premier est issu de la coagulation par la présure, le second en utilisant l'extrait brut de *Sardina Pilchardus*, et le troisième en utilisant l'extrait brut de *Dasyatis Pastinaca*.

Évaluation sensorielle hédonique des produits expérimentaux est réalisée au niveau du laboratoire d'analyse sensorielle, de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, et ceci en utilisant un jury naïf dont la majorité des dégustateurs sont des jeunes de 20 à 30 ans. Une présentation des trois types de fromages est exposée de façon anonyme (A, B, C) aux dégustateurs sachant que : A : fromage élaboré a partir de la présure, B fromage élaboré a partir de *Sardina Pilchardus* et C fromage élaboré a partir de *Dayastis Pastinaca*.



Figure 10 : Photographie de l'exposition des trois échantillons de fromage.

Résultats et discussions

I. Caractérisation physico-chimique des l'extraits bruts

Les résultats obtenus lors de la caractérisation physicochimiques des espèces étudiés sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau II : Résultats de l'activité protéolytique des extraits bruts étudiés

Espèces	Activité protéolytique (ug/ml.min)
<i>Balistes Capriscus</i>	0,13 ± 0,02
<i>Dasyatis Pastinaca</i>	0,21 ± 0,04
<i>Sardina Pilchardus</i>	0,18 ± 0,05
<i>Mullus</i>	0,05 ± 0.003
<i>Solea Solea</i>	0.07± 0.03
<i>Boops Boops</i>	0.15± 0.01

Sur les six espèces de poissons étudiées, notre travail s'est focalisé sur deux échantillons à savoir *Sardina Pilchardus* (la sardine) et *Dasyatis Pastinaca* (la raie) en se référant aux résultats retrouvés lors des analyses de caractérisation effectués (évaluation de l'activité protéolytique) et après une étude statistique effectuée ultérieurement.

Les résultats obtenus lors de la caractérisation des extraits sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III : Caractéristiques physicochimiques des deux extraits enzymatiques étudiés

	E 1	E 2
Protéine (mg/ml)	1,39 ± 0,07	3,04 ± 0,35
Activité protéolytique (ug/ml.min)	0,18 ± 0,05	0,21 ± 0,04
Activité enzymatique spécifique (ug/mg.min)	0,13	0,07
Force coagulante (US)	18,11	24,34
Couleur	Rougeâtre	Verdâtre
Texture	Fluide	Visqueuse

D'après les résultats obtenus on remarque que la couleur de E1 est rougeâtre tandis que la couleur de E2 est verdâtre, cela est due à la dilution et les quantités de tampons utilisées lors de l'extraction. La texture de *Sardina Pilchardus* est visqueuse tandis que pour *Dasyatis Pastinaca*, elle est fluide.

Les résultats obtenus dans la présente étude, concernant les caractéristiques physicochimiques, confirment ceux publiés par **Nouani et al (2009)** et **Hamrani (2008)** lors de leurs travaux sur les pepsines de poulet et de poisson.

D'après les résultats obtenus, la teneur en protéine mesurée selon la méthode de Bradford, varie de 1.39 ± 0.07 (mg/ml) à 3.04 ± 0.35 (mg/ml). La valeur la plus élevée est celle de l'extrait E2 correspondant à l'extrait de *Sardina Pilchardus* tandis que la plus faible est retrouvée dans l'extrait E1 correspondant à l'extrait de *Dasyatis Pastinaca*.

Selon **Boury (1960)** Le type et la quantité totale de protéines digestives varient en fonction de l'espèce et de l'alimentation du poisson. Les résultats des travaux d'**Alarcon et al (1997)** et **Boury (1960)** ont démontré également que ces protéases possèdent des

propriétés liées à leur habitat. Ces protéases digestives sont considérées actuellement comme étant les enzymes marines les plus utilisées dans le domaine biotechnologique (**Bougatef, 2013**).

Les résultats obtenus lors de l'estimation de l'activité protéolytique sont exprimés par le taux de Tyrosine libéré (**Boucherine et Ouchene, 2017**).

Les résultats obtenus varient de 0.18 ± 0.05 (ug/ml.min) à 0.21 ± 0.04 (ug/ml.min). L'activité la plus élevée est remarquée chez E2 correspondant à *Sardina Pilchardus* et la plus faible chez E1 représentant *Dayastis Pastinaca*.

L'activité enzymatique spécifique de l'extrait E2 est quant à elle inférieure à celle d'E1, qui est égale à 0.07 (ug/mg.min) et 0.13 (ug/mg.min) respectivement.

Les résultats obtenus de la présente étude montrent que les deux extraits possèdent une activité coagulante qui est exprimée par la force coagulante de E2 qui est de 24.34 Unité Soxhlet (US) qui est légèrement supérieure à celle de E1 égale à 18.11 Unité Soxhlet (US).

Cette différence entre ces deux extraits est due à plusieurs facteurs, tels que le climat, la saison de pêche ainsi que le taux d'ensoleillement (**Durand et Chantraine, 1982**).

II. Etude des paramètres influençant l'activité enzymatique des extraits bruts

1. Influence de la température sur l'activité coagulante

Les enzymes sont influencées par les variations de température, sachant que chaque enzyme se caractérise par une température optimale spécifique (**Robitaille et al, 2012**).

De ce fait, au cours de notre étude, nous avons réalisé des tests afin d'évaluer l'influence de la température sur l'activité coagulante de nos extraits enzymatiques à savoir *Sardina Pilchardus* et *Dasyatis Pastinaca* dans un intervalle variant de 35°C à 70°C.

Les résultats sont représentés dans le graphe ci-dessous :

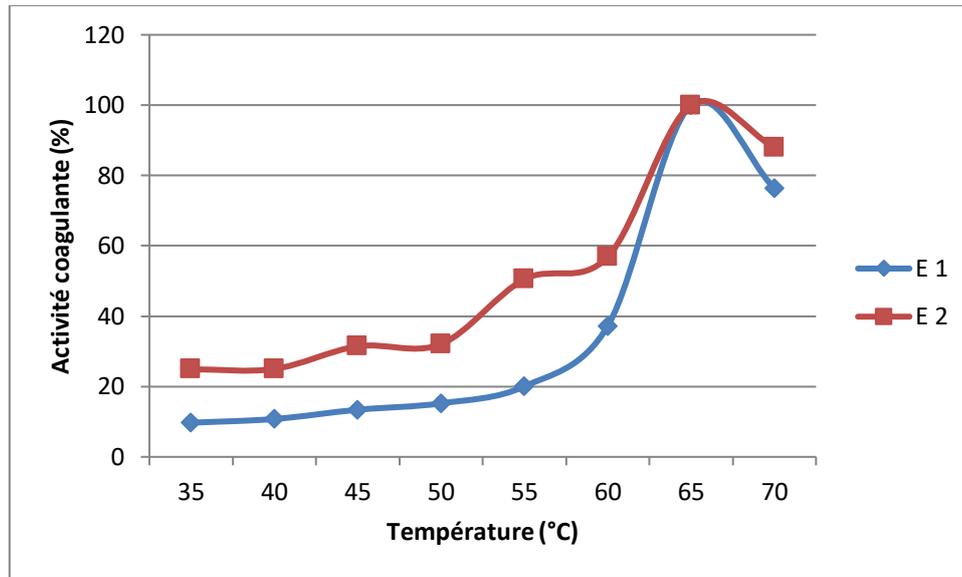


Figure 11 : Présentation graphique de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés

E1 : *Dasyatis Pastinaca*

E2 : *Sardina Pilchardus*

Les résultats obtenus montrent que la variation de la température influence fortement l'activité enzymatique des extraits étudiés.

Selon le graphe obtenu, l'activité coagulante est proportionnelle à la température pour les deux extraits jusqu'à atteindre un certain seuil où l'activité est maximale.

Pour l'extrait enzymatique de *Dasyatis Pastinaca*, l'activité coagulante passe d'une valeur de 18.1 Unité Soxhlet à 35°C, atteint ensuite son optimum à une valeur de 186.6 Unité Soxhlet à une température de 65°C.

Concernant l'extrait de *Sardina Pilchardus*, on passe d'une activité d'une valeur de 24.3 Unité Soxhlet à 35°C, jusqu'à atteindre son optimum également à 65°C avec une valeur de 97.6 Unité Soxhlet.

Silva et al (2014) ont rapporté que l'activité coagulante augmente progressivement jusqu'à atteindre son optimum à une température de 65°C, au delà, l'activité diminue.

En effet, l'augmentation de la température provoque une agitation plus élevée des molécules du milieu, conduisant ainsi à la rencontre des réactifs présents. Ces molécules

libèrent de l'énergie suite à un choc entre elles, permettant ainsi d'atteindre plus rapidement l'énergie nécessaire à la réaction. (**Özer et al, 2010; Kumar et al, 2012; Bayraktar et Önal, 2013**).

L'effet de la température est le résultat d'une action conjuguée de deux effets. Le premier qui est un effet sur la réaction enzymatique et le deuxième est un effet sur l'étape d'agrégation. (**Horne et Banks, 2004**)

Au delà d'une certaine température, l'activité diminue en raison de la dénaturation des protéines, qui se passe en deux étapes, dont le premier est la modification des structures dues à la rupture des liaisons, et la deuxième qui est le changement de la structure primaire de l'enzyme pour cause de l'endommagement des acides aminés par le chauffage. (**Bayraktar et Onal, 2013**)

2. L'influence de la variation du pH sur l'activité protéolytique

Le potentiel d'hydrogène influence l'activité enzymatique. En effet, il existe un potentiel d'hydrogène optimal, cela veut dire que c'est la valeur autour de laquelle l'enzyme possède une forte activité et sera plus efficace.

Ce pH optimal, est spécifique à chaque enzyme, mais généralement, sa valeur se situe aux alentours de 6-7 (l'équivalent d'un pH neutre). Plus on s'éloigne de cette valeur, plus l'enzyme est dénaturée et perd ses caractéristiques spécifiques.

En effet, l'acidité du milieu peut engendrer la déformation de la structure tertiaire d'une enzyme, et ceci se produit lorsqu'on s'éloigne de la valeur du pH optimal de façon plus ou moins importante selon le degré d'éloignement. De ce fait, il en résulte la modification de l'action et l'activité de l'enzyme ainsi que la réduction de sa vitesse catalytique (**Robitaille et al, 2012**). Cependant, si l'acidification du milieu augmente l'activité coagulante des protéases acides il aura alors un effet similaire sur l'activité protéolytique au cours de la maturation (**Grenn et al, 1984**).

Dans notre étude, on a choisit d'étudier l'effet du pH sur l'activité protéolytique selon le protocole décrit, et bien évidemment, si l'activité protéolytique de nos extraits est impactée, il en résulte d'avantage une influence sur l'activité coagulante.

L'effet du pH a été étudiée en ajustant le pH du tampon acétate utilisée lors de la mesure de l'activité protéolytique aux valeurs situées entre 5 et 8 en fixant les mêmes

valeurs de la caséine ainsi que de l'extrait enzymatique à savoir *Sardina Pilchardus* et *Dayastis Pastinaca* (400ml et 200ml respectivement) et également le temps d'incubation de 30minutes.

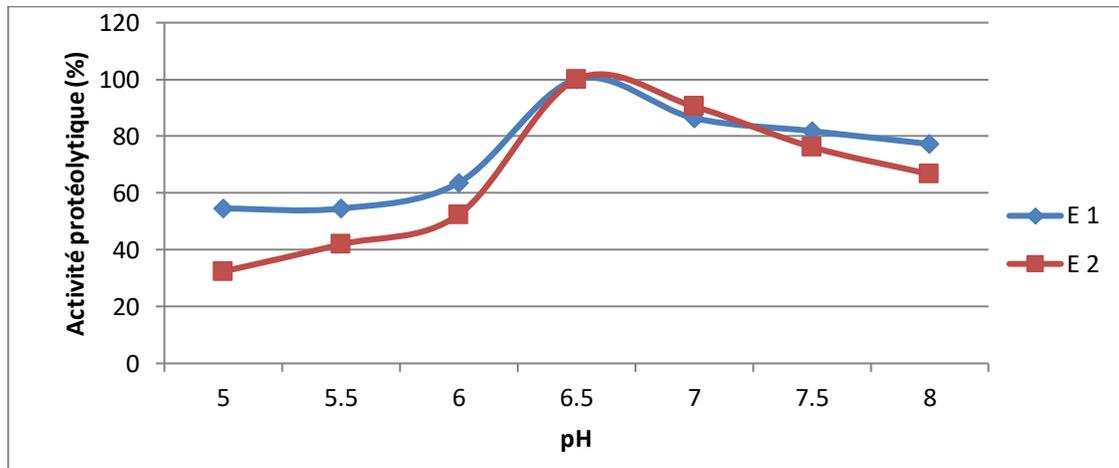


Figure 12 : Présentation graphique de la variation de l'activité coagulante en fonction du pH.

E1 : *Dasyatis Pastinaca*

E2 : *Sardina Pilchardus*

Les résultats obtenus montrent que le pH influence fortement l'activité protéolytique de nos extraits enzymatiques. Selon le graphe, cette activité augmente graduellement avec l'augmentation du pH jusqu'à un certain point puis elle diminue.

En effet, on voit à travers le graphe que l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique « E1 » à savoir *Dasyatis Pastinaca* est d'une valeur de 32.38% à un pH 5, ainsi que pour l'extrait de *Sardina Pilchardus* « E2 » qui elle est d'ordre de 54.54% au même pH (pH 5), puis les deux activités augmentent progressivement et continuellement. A pH 6.5 les deux extraits atteignent une activité d'ordre de 100%.

Au-delà de 6.5, on remarque une diminution de l'activité protéolytique des deux extraits étudiés.

Ces résultats démontrent que l'activité protéolytique augmente au fur et à mesure de l'augmentation du pH, jusqu'à atteindre le pH optimal qui, dans notre cas, de 6.5. L'activité la plus élevée est remarquée à pH 6.5, puis diminue 20 à 30 % à pH 8. De ce fait, on confirme que l'enzyme est instable à pH acide et qu'elle est plus efficace à pH 6,0-6.5.

L'influence du potentiel d'hydrogène (acidification) sur l'activité coagulante et le temps d'apparition des floculations est le résultat d'un effet conjugué sur l'activité enzymatique ainsi que sur la réaction d'agrégation mais aussi sur la stabilité des micelles, ces effets s'expliquent d'une part, par la neutralisation des charges négatives, et d'autre part par la libération des ions de calcium Ca^{2+} provenant des complexes dissous et colloïdaux (Ramet, 1997).

3. Influence de la concentration en chlorure de calcium sur l'activité coagulante

La concentration en chlorure de calcium (CaCl_2) influence fortement sur l'hydrolyse de la caséine α_1 par les enzymes coagulants du lait. Cela s'explique principalement aux changements des structures des caséines du lait. (Afsharnejhad *et al*, 2019)

L'augmentation du taux d'agrégation des protéines est liée à la diminution du pH, qui est le résultat de l'addition du chlorure de calcium au lait. (Flüeler et Puhon, 1978; Gastaldi *et al*, 1994).

L'étude de l'influence de la concentration en chlorure de calcium (substrat de Bridge) sur l'activité coagulante à été faite en variant ces concentrations allant de 0.005M, 0.01 M, 0.02 M, 0.03 M, 0.04 M, et 0.05 M.

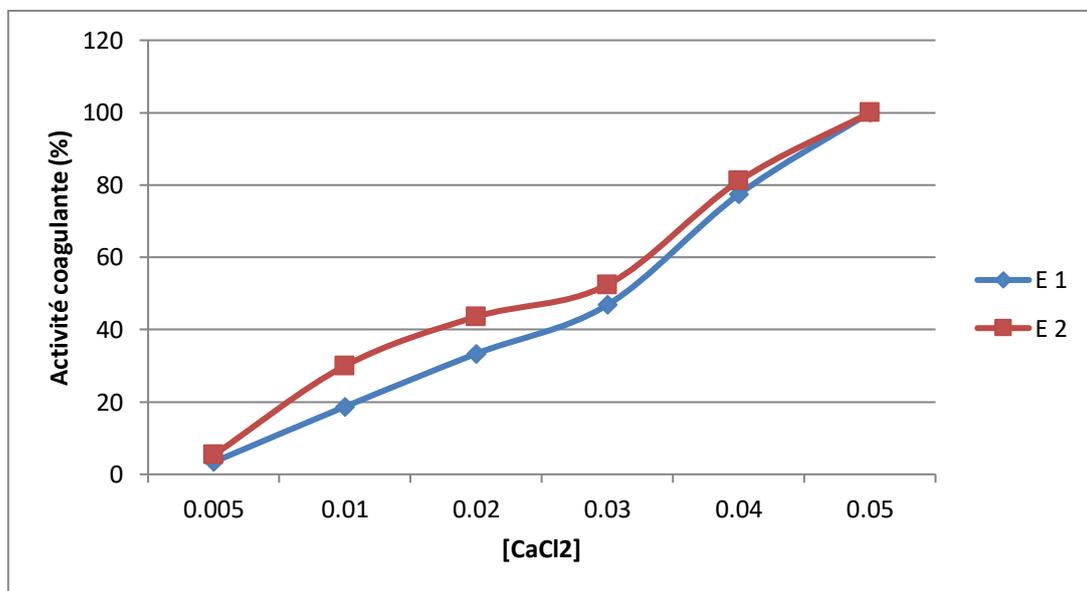


Figure 13 : Présentation graphique représentant l'effet de la variation de la concentration en chlorure de calcium sur l'activité coagulante.

E1 : *Dasyatis Pastinaca*

E2 : *Sardina Pilchardus*

Les résultats obtenus montrent que l'activité coagulante des deux extraits E1 et E2 augmentent graduellement en allant de 3.41% qui est égale à 3.30 Unité Soxhlet (US) pour E1 à une concentration de 0.005M puis atteint les 100% à une concentration de 0.05M qui correspond à 96.87 Unité Soxhlet (US), de même pour E2 qui débute avec 5.33% égale à 2.98 Unité Soxhlet (US) à 0.005M de CaCl_2 jusqu'à 100% correspondant à 55.88 Unité Soxhlet (US) atteinte à la même concentration qui est de 0.05M.

De ce fait, on confirme que plus on augmente la concentration en chlorure de calcium plus l'activité coagulante de nos deux extraits augmentent où la valeur la plus élevée de l'activité coagulante de nos extraits E1 et E2 (96.87 et 55.87 Unité Soxhlet respectivement) est remarquée à une concentration de 0.05M.

Selon **Hafid *et al* (2020)**, le temps de coagulation du lait diminue par ajout des chlorures de calcium. Ceci est confirmé par les résultats obtenus. Ces résultats sont similaires à ceux retrouvés par les auteurs **Storry *et al* (1983)** ; **Tervalá *et al* (1986)** ; **Moutilla *et al* (1995)** et **Balcones *et al* (1996)**.

En effet, ces derniers rapportent que l'addition de Chlorure de calcium induit à la réduction du temps de coagulation du lait qui se traduit par l'augmentation de l'activité coagulante.

Ceci est aussi confirmé par les résultats obtenus par **Maachou (2004)** et **Slamani (2004)** démontrant que l'activité de la pepsine extraite des viscères de poisson est optimale à une concentration entre 0.05M et 0.06 M.

Selon **Daviau *et al* (2000)**, Le calcium apporté sous forme de CaCl_2 conduit à une augmentation de la force ionique et une diminution du pH ainsi qu'à une augmentation de la solubilité du phosphate de calcium. De ce fait, il en résulte une augmentation en concentrations du calcium soluble et ionique.

Cela est confirmé par d'autres auteurs **Daviau (2000)** et **Nájera (2003)**, qui prouvent que les interactions électrostatiques ainsi que les répulsions stériques jouent un rôle dans la déstabilisation de système micellaire et donc sur le processus de coagulation du lait.

4. Influence de la concentration en extrait enzymatique sur l'activité coagulante

D'après **Ramet et Weber (1980)**, la concentration en enzyme influe sur la vitesse de l'apparition et le raffermissement du gel et donc sur l'activité coagulante.

L'effet de la concentration des extraits enzymatiques étudiés à savoir *Dayastis Pastinaca* et *Sardina Pilchardus* et (E1, E2 respectivement) sur l'activité coagulante et leurs capacité à coaguler le lait a été étudiée en variant la concentration de ces extraits tels que : 500ul, 550ul, 650ul, 750ul, 850ul, 950ul, 1000ul.

Les résultats obtenus sont représentés dans le graphe ci-dessous :

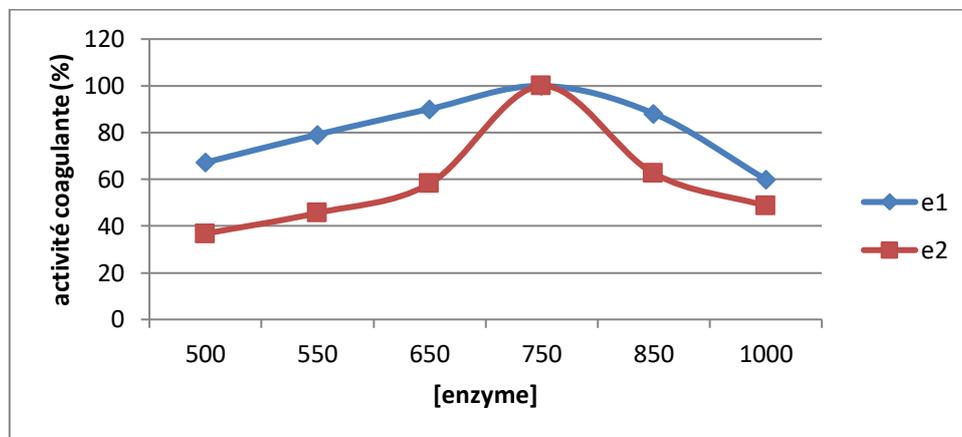


Figure 14 : Présentation graphique représentant l'effet de la variation de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante.

E1 : *Dasyatis Pastinaca*

E2 : *Sardina Pilchardus*

Selon le graphe, E1 représentant l'activité coagulante de *Dasyatis Pastinaca*, elle est d'ordre de 67,20% qui est égal à 24,34 Unité Soxhlet à 500ul, elle augmente graduellement avec l'augmentation de la concentration en extrait puis atteint son optimum de 100% l'équivalent de 36,22 Unité Soxhlet à 750ul. A partir de là, on remarque une diminution continue de l'activité jusqu'à atteindre les 1000ul avec une activité égale à 59,94 % valeur qui est égale à 21,71 Unité Soxhlet. L'activité la plus élevée est donc remarquée à une concentration égale à 750ul, et la plus faible est remarquée à 1000ul.

Quant à la représentation graphique de E2 qui lui représente l'activité coagulante de *Sardina Pilchardus*, elle est d'ordre de 36,78% qui est égale à 6,66 Unité Soxhlet (US) à 500ul, en corrélation avec l'extrait de *Dasyatis Pastinaca*, elle augmente graduellement

jusqu'à atteindre les 100% avec une activité égale à 18.11 Unité Soxhlet, puis décroît graduellement aux alentours de 8.81 Unité Soxhlet à un pourcentage de 48.65% à une concentration de 1000ul. La valeur la plus élevée est obtenue à 750ul, et la plus faible à 1000ul.

La différence entre E1 et E2 peut être due à l'effet de dilution de l'extrait enzymatique.

Mcmahon *et al* (1984a) et **Carson *et al* (1987)**, ont démontré que le temps nécessaire à la coagulation est inversement proportionnel à la concentration en enzyme, c'est-à-dire que lorsqu'on augmente la concentration en enzyme, le temps de coagulation diminue.

Cela a été confirmé par **Amimour (2019)**, le temps de floculation diminue progressivement puis tend vers une valeur constante.

III. Elaboration du fromage

Le processus de fabrication du fromage a abouti à la formation de deux fromages qui sont fabriqués à base de nos extraits et un échantillon a en utilisant de la présure. Les fromages obtenus sont représentés ci-dessus :

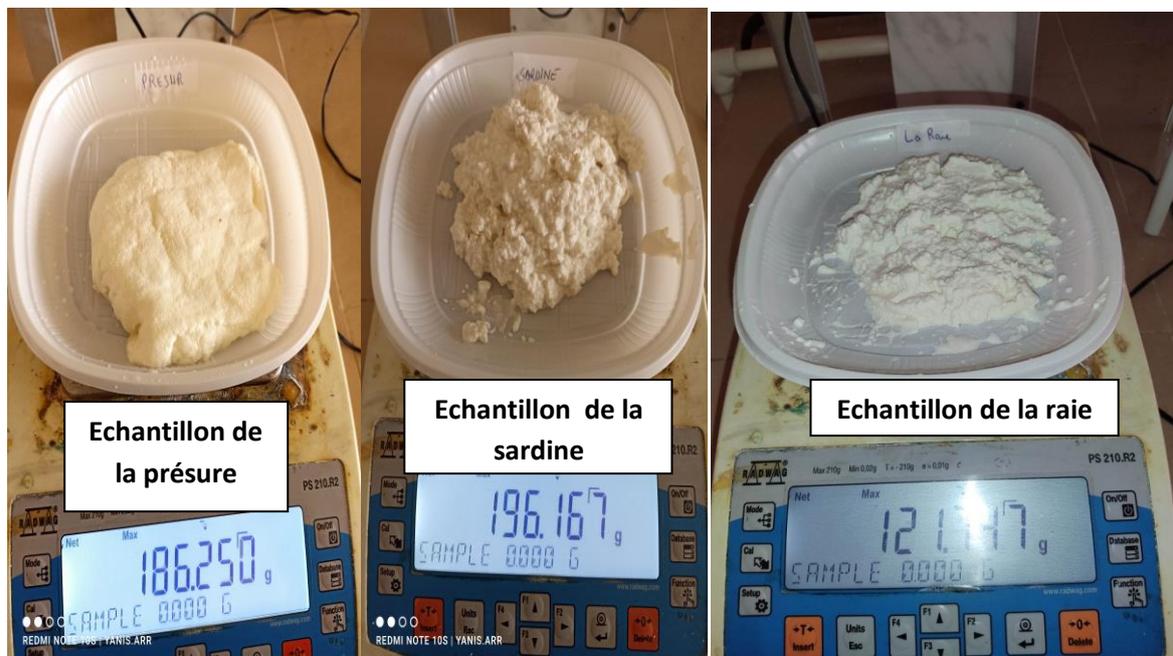


Figure 15 : Présentation des fromages obtenus

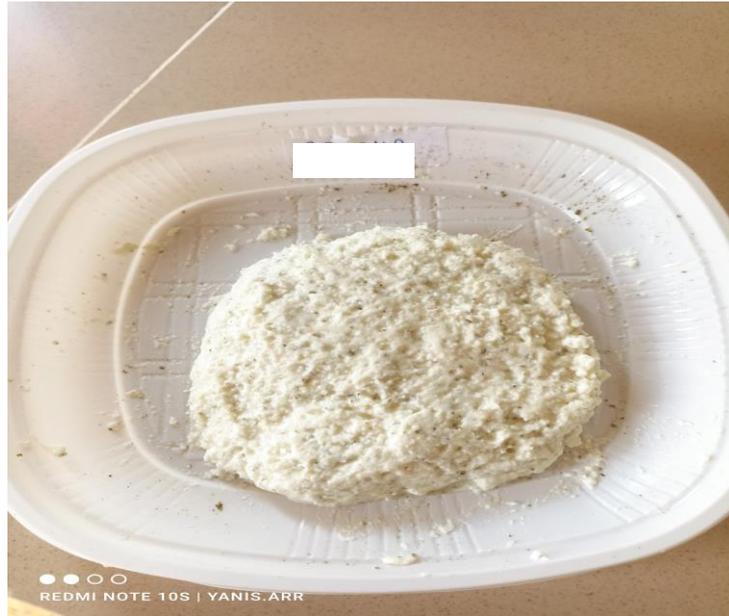


Figure 16 : Photographie du fromage élaboré avec de la présure après assaisonnement

IV. Analyses sensorielles :

Les résultats obtenus lors de l'analyse sensorielle sont représentés ci-dessous :

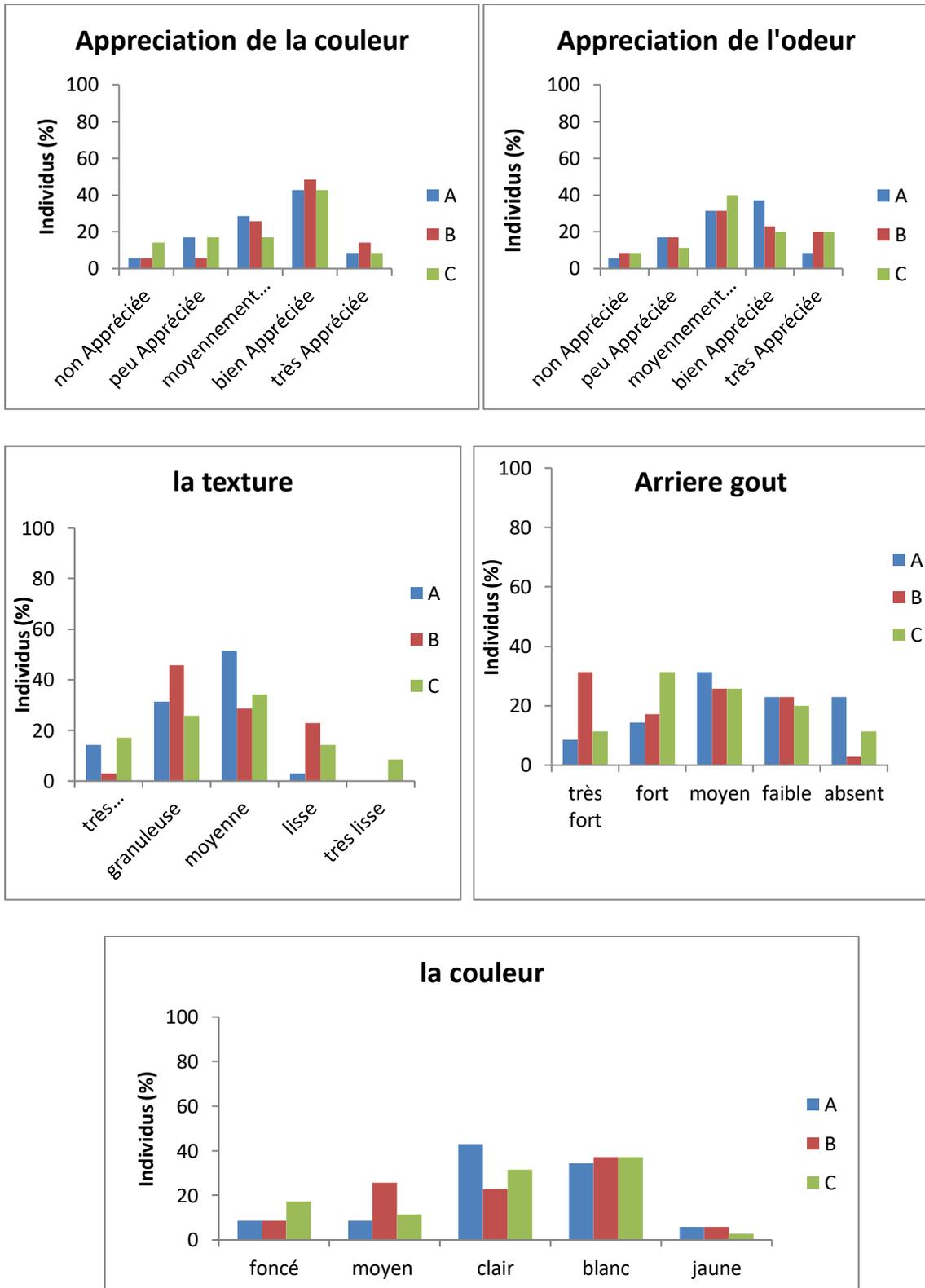


Figure 17 : Présentation graphique de l'analyse sensorielle.

Où :

A : Fromage élaboré à partir de la **Présure**

B : Fromage élaboré à partir de *Sardina Pilchardus*

C : Fromage élaboré à partir de *Dyastis Pastinaca*.

D'après les résultats obtenus il est clair que les trois échantillons présentent des différences et des similarités selon les dégustateurs :

En ce qui concerne l'appréciation de la couleur, 49% des dégustateurs ont bien apprécié l'échantillon B face à 43 % concernant les échantillons A et C. cela veut dire que nos trois échantillons sont assez similaires concernant cet aspect.

Pour l'appréciation de l'odeur, 37% des dégustateurs ont noté A comme étant le meilleur face aux échantillons B (23%) et C (20%), cela démontre que l'odeur des échantillons B et C est légèrement prononcé par rapport à celle de l'échantillon A, probablement due à l'assaisonnement effectués.

Les candidats ont moyennement apprécié la texture des échantillons B et C (29% et 34%) cela est probablement due à la nature du caillé obtenue qui contient en faible proportion des grains, tandis que pour A (51%) sa texture est plutôt bien appréciée en vue de son aspect plus ou moins lisse.

Quant à l'arrière goût, 31% des dégustateurs ont identifié l'intensité de l'arrière goût de l'échantillon A comme étant moyenne, tandis que la même proportion de dégustateurs (31%) ont trouvé que l'intensité de l'arrière goût de l'échantillon B est très forte, notamment, pour l'échantillon C, la majorité des dégustateurs l'ont signalé comme forte.

Concernant la couleur de nos extraits, la majorité des dégustateurs ont mentionné que la couleur de l'échantillon de A est clair tandis que pour B et C leurs couleurs vire vers le blanc montrant ainsi la ressemblance et la similarité de nos échantillons.

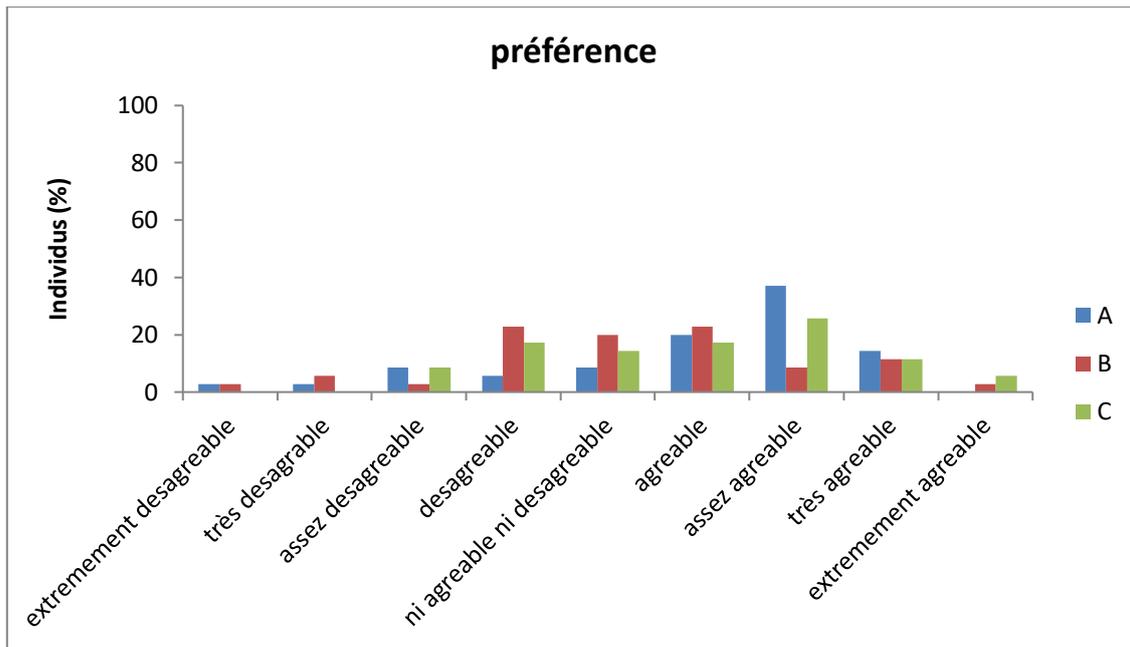


Figure 18 : Présentation graphique de la préférence des dégustateurs.

Enfin, sur les trois échantillons, le fromage obtenu par la présure est légèrement plus apprécié que ceux élaborés par la *Sardina Pilchardus* et *Dayastis Pastinaca* et cela est dû à l'apparition d'une légère odeur et amertume.

Au terme de cette analyse sensorielle, on peut affirmer que les enzymes coagulantes d'origine animale peuvent être utilisées dans la fabrication du fromage frais. Mise à part le fait de l'apparition d'odeur et d'arrière goût désagréable, les paramètres de nos extraits sont assez proches de ceux de la présure.

Conclusion

Notre étude est réalisée dans le but d'une contribution à la recherche, caractérisation et purification d'enzyme coagulante, ainsi que de prouver l'existence de sources potentielles de succédanés de présure par les enzymes contenues dans les extraits clarifiés d'origine animale (poisson) issue du système digestif de *Sardina Pilchardus* (sardine) et *Dasyatis Pastinaca* (la raie).

Afin d'atteindre l'objectif de notre travail, notre démarche s'est déroulée en deux étapes, la première étant l'extraction des enzymes coagulantes contenues dans les viscères des poissons pour avoir les extraits bruts des deux espèces, et la caractérisation de ce dernier en mesurant leurs teneurs en protéines ainsi que la détermination de leurs activités enzymatique à savoir : l'activité protéolytique et coagulante.

La deuxième étape correspond à l'étude de l'influence et la détermination des caractéristiques physicochimiques du lait en variant les valeurs du potentiel d'hydrogène, concentration en enzyme, concentration en chlorure de calcium et la température, ainsi que son aptitude à la coagulation sur les activités obtenues.

Les caractéristiques des extraits étudiés sont :

- La couleur de l'extrait obtenu à partir de la *Sardina Pilchardus* est verdâtre tandis que pour l'extrait de *Dasyatis Pastinaca*, sa couleur est rougeâtre
- En ce qui concerne leur texture, elle est visqueuse pour l'extrait de la *Sardina Pilchardus*, et celle de *Dasyatis Pastinaca* quant à elle est fluide.
- La teneur en protéines la plus élevée est retrouvée chez l'extrait de la *Sardina Pilchardus* qui est égale à de 3.04 ± 0.35 , la plus faible est observée chez celui de *Dasyatis Pastinaca* en comparant entre nos deux échantillons 1.39 ± 0.07 (mg/ml),
- Concernant l'activité protéolytique, elle est d'ordre de à 0.21 ± 0.04 (ug/ml.min) pour l'extrait de la *Sardina Pilchardus*, et de 0.179 ± 0.05 (ug/ml.min) pour *Dasyatis Pastinaca*.
- L'activité coagulante est elle aussi supérieure chez l'extrait de la *Sardina Pilchardus* par rapport à celui de *Dasyatis Pastinaca* avec des valeurs de 24.34 Unité Soxhlet (US) et 18.11 Unité Soxhlet (US) respectivement.

L'étude de l'influence des paramètres physicochimique du lait sur les activités obtenus des deux extraits, ont révélées des résultats satisfaisant et promoteurs où l'on conclut que :

- Lorsque la température augmente, le temps de coagulation diminue.
- Le potentiel d'hydrogène également influence l'activité protéolytique de façon à ce que cette activité augmente graduellement avec l'augmentation du pH.
- Les deux concentrations à savoir les concentrations en enzyme et en chlorure de calcium influence également ces activités de manière à ce que lorsqu'on augmente la concentration, le temps de coagulation diminue.

L'élaboration d'un fromage frais par l'utilisation de nos extraits a démontré que les deux fromages obtenus présentent des caractéristiques organoleptiques assez proches de celui de la présure (industrielle), avec certaines distinctions quant à l'odeur, goût et arrière goût.

En conclusion, les résultats obtenus semblent être très intéressants et très promoteurs, ils mettent en évidence la possibilité de remplacement de la présure par des matières premières d'origine animale non exploitées.

Il serait également intéressant de poursuivre ce travail en effectuant des recherches :

- L'étude des paramètres influençant l'extraction des enzymes des espèces marines dans le but d'améliorer le rendement ainsi que la qualité.
- La purification des enzymes coagulantes de diverses origines.
- Etude de la possibilité d'utilisation de ces enzymes afin d'élaborer d'autres types de fromage.

Références bibliographiques

A

- **Afsharnezhad, M., Shahangian, S. S., ET Sariri, R. (2019).** A novel milk-clotting cysteine Biologiprotease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. *International Journal of cal Macromolecules*, 121, 173-182
- **Alloggi V., Caponio F., Pasqualone A., Gomes Tommaso., (2000).** Effect of heat reatment on the rennet clotting time of goat and cow milk. *Food Chemistry*, 70: 5155
- **AMIMOUR M. (2019).** Essais D'optimisation De Procédé De Fabrication Des Fromages Traditionnels Du Qualité (J'ben). These De Doctorat De Science Et Technologie Alimentaire. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. 121p.
- **Amiot J., Fournier S., Leboeuf Y., Paquin P. Et Simpson R. (2002) :** composition, propriétés physico-chimique, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyses du lait.
- **Amira A. B., Besbes S., Attia H., & Blecker C. (2017).** Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(1), p.p.76-93.
- **Andren A. (2002).** Rennets and coagulants pp281-286 in *Encyclopedia of Dairy Science*. Roginski H.,Fuquay J. Fox P. Elsevier
- **Anema Sg., Lee Sk., Klostermeyer H.,(2005).** Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin. *LWT Food Science and Technology*, 40: 99-106.

B

- **Balcones E., Olano A., Calvo Mm., (1996).** Factors affecting the rennet clotting• properties of ewe's milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44: 1993-1996
- **Balti R (2011).** Valorisation des produits et co-produits de la seiche commune (*Sepia officinalis*) pour l'obtention de biomolécules à haute valeur ajoutée à usage alimentaire et nutraceutique. Thèse de doctorat en génie biologique, Université de Lille 1 sciences et technologie et université de Sfax-Tunisie, 248 p.
- **Barbano, D. M., And Rasmussen, R., (1992).** Cheese yield performance of fermentation produced chymosin and other milk coagulants. *J.dairy Sci.*75:1-12.1992.
- **Barkia, A., Bougatef, A., Nasri, R., Fetoui, E., Balti, R., et Nasri, M. (2010).** Trypsin from the viscera of Bogue (Boops boops): isolation and characterisation. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Fish Physiol Biochem*, 36(4), 893-902. doi: 10.1007/s10695-009-9365-z

Références bibliographique

- **Bayraktar, H., et Önal, S. (2013).** Concentration and purification of α -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning. Separation and purification technology, 118, 835-841.
- **Blum M., Cunningham A, Bendiner M., Hofmann T., (1985).** Penicillopepsin, the aspartic proteinase from *Penicillium janthinellum*: substrate-binding effects and intermediates in transpeptidation reactions. Biochem. SOC. Trans, 13, 1044-1046.
- **Bouacherine, M. and Z. Ouchene (2017) :** Valorisation d'un savoir-faire Kabyle pour son application industrielle : Caractérisation d'un fromage à pâte molle fabriqué à partir du lait de vache coagulé avec l'enzyme du *Ficus carica* L, Université de Bouira Bougara, Boumerdes.p 24
- **Boughellout, H. (2007).** Coagulation du lait par la pepsine du poulet. Mémoire magister, université Mentouri constantine, 69p.
- **Boumediene F. (2021).** Etudes Des Propriétés Biochimiques, Sensorielles Et Rhéologiques Des Fromages Fabriqués A Base De Présure De Remplacement D'origine Végétale (*Cynara Scolymus*) Et Microbienne (*Bacillus Velezensis* Fk6a, *Mucor Circinelloides* Sf15). These De Doctorat En Science Agronomique. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El Harrach, Alger, 162p.
- **Bourgeois C., Larpent J. P., (1981).** Microbiologie alimentaire : les Fermentations alimentaires. Paris : APRIA, Ed. Lavoisier. Tec et Doc, 334p.
- **Bouyoucef, Y., A. Taouzinet, et al. (2016).** "Obtention et caractérisation d'une protease coagulante de *Penicillium* sp."
- **Bradford M., (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical biochemistry 72(1-2): 248-254

C

- **Carson A., Hill C., Olson Nf.,(1987).** Kinetics of milk coagulation: III mathematical modelling of the kinetics of curd formation following enzymatic hydrolysis of kappa casein-parameter estimation. Biotechnology and Bioengineering, 29: 601-611
- **Christen (C.) Et Virasoro (E.) 2017.** *Le Lait*, 1935, t.15, p. 354 et 496.

D

- **Desmazeaud M., (1997).** Les enzymes utilisées en industrie laitières PP582-602 in Laits et produits laitier scoord. Luquet F.M. Tech et Doc Lavoisier.
- **Drohse H. B., Foltmann B., (1989).** Specificity of milk-clotting enzymes towards bovine κ -casein, Biochimical and Biophysica Acta, 995, 221-224. And heat treatment. Lait, 80: 397415.
- **Dussault-Chouinard, I. (2019).** Amélioration des performances fromagères des concentrés laitiers d'osmose inverse: phase de coagulation par la présure.

E

- **Eck A., (1987).** Le fromage. Paris, Lavoisier, Tec et Doc., 891p.
- **Ernstrom, C.A., AND Wongt, N.P., (1983).** Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In :Fundamentals on dairy chemistry. Ed., B.H. Webb, A.H.Johnson and J.A. Alfold .2ème ed,the Avi publishing Company Inc, p. 662-771, 929p

F

- **Flüeler O., And Puhanz . , (1978).** Neue Erkenntnisseüber die Labträglichkeit der Milch SchweizerischeMilchwirtschaftlicheForschung7:61-68.

G

- **Gastaldi E., Pellegrini O., Lagaude A., And De La Fuente Bt., (1994).** Functions of added calcium in acid milk coagulation. Journal of food science 59:310-312
- **Génin G : (1968)** Les succédanés de la présure. Le lait 48:53-59.
- **GREEN, M.L., VALLER, M.J., and KAY, J. (1984)** Assessment of the suitability for cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin préparations. J. dairy Research 51:331-340

H

- **Hafid, K., John, J., Sayah, T. M., Domínguez, R., Becila, S., Lamri, M., ... & Gagaoua, M. (2020).** One-step recovery of latex papain from Carica papaya using three phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent. International journal of biological macromolecules, 146, 798-810.
- **Harboe M, Broe M and Qvist K (2010).** The production, action and application of rennet and coagulants. Technology of cheesemaking 2.
- **Horne D and Banks J., (2004).** Rennet-Induced Coagulation of Milk. Cheese: Chemistry, Physics And Microbiology 1:47-70.

J

- **Jacob M, Jaros D, Rohm H. (2011).** Recent advances in milk clotting enzymes. *International journal of dairy technology* 64(1):14-33.
- **Jaros, D., Rohm, H., (2017).** Rennets Cheese, P.P.53-67.& : Applied Aspects.
- **Jeantet R, Croguennec T, Garric G and Brulé G (2017a)** Initiation à la technologie laitière, Editions Tec Doc Lavoisier.
- **Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P., Brule G. (2008).** Les produits laitiers - 2ème édition. TEC&DOC. Paris: EMD S.A.S.176p.
- **JEANTET Romain, C. T., GARRIC Gilles, BRULÉ Gérard. (2017b).** Initiation a la technologie fromagère (Editions Tec Doc Lavoisier. Ed. Vol. 2).

K

- **Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson B K (2007).** Trypsins from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomos Saltatrix*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148B: 382-389.
- **Klomklao S, Kishimura H, Benjakul S (2008).** Endogenous proteinases in true sardine (*Sardinops melanostictus*). *Food Chemistry*, 107: 213-220.
- **Kumar VV, Sathyaselvabala V, Premkumar M, Vidyadevi T and Sivanesan S (2012)** Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74:63-72.

L

- **Larsson KI, Andren A., (1999).** Interactions between chymosin and individual or micellarcaseins. *International Dairy Journal*, 9: 381-382.
- **Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951).** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. doi: 10.1016/s0021-9258(19)52451-6
- **Lucey, J.A. (2002)** Rennet coagulation of milk In: *Encyclopedia of Dairy Science*.Ed., H. Royinski, J.Fuquay and P.Fox, Elsevier science Ltd, p. 286-293.
- **Lucey, J.A. (2016).** Acid Coagulation of Milk. In P.L. H. Mcsweeney and J.A. O'Mahony (Eds), *Advanced Dairy Chemistry : Volume 1B : Proteins : Applied Aspects* (pp. 309-328). New York, NY: Springer New York.

M

- **Maachou D. (2004)**. Extraction et purification de protéase coagulant le lait en vue de leur substitution à la présure traditionnelle : Essai d'obtention d'une protéase issue d'estomac de poisson (*Serioladumerili*). Mémoire de Magister en Science Agronomie. Université de Boumerdès-M'hamedBougara.
- **Mahaut M., Jeantet R. Brulé G. 2000**. Initiation à la technologie fromagère. Editions Tech et Doc, Lavoisier. Londres, Paris, New york
- **McMahon DJ, Richardson G and Brown R (1984)** Enzymic milk coagulation: Role of equations involving coagulation time and curd firmness in describing coagulation. *Journal of dairy science* 67:1185-1193.
- **Meitton B., Desmazeaud M., de Roissart H. & Weber F., (1994)**.- Transformation du lait en fromage. In : de Roissart H. & Luquet F.M. (Coord.). *Les bactéries lactiques (Vol.II)*.Ed. Loriga, Uriage, FR, pp.55-133.
- **Moutilla A., Balcones E., Olano A., Calvo Mm., (1995)**. Influence of heat treatments on whey protein denaturation and rennet clotting properties of cow's and goat's milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43 : 1908-1911.

N

- **Najera Ai., De Renobales M., Barron Ljr (2003)**. Effects of pH, temperature, $CaCl_2$ and enzyme concentrations on the rennetclotting properties of milk multifactorial study. *Food Chemistry*, 80: 345-352.
- **Neyers F. (2013)** Les fondamentaux fromagers : simplifier pour mieux comprendre. Deuxième partie : préparer le caillé pour en faire « tout un fromage ». *Revue des ENIL* n°325, Mai - Juin
- **Nouani A, Dako E, Morsli A, Belhamiche N, Belbraouet S, Bellal M and Dadie A (2009)** Characterization of the purified coagulant extracts derived from Artichoke Flowers (*Cynara scolymus*) and from the Fig Tree Latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J Food Technol* 7:20-29.
- **Nouani A., Belhamiche N., Slamani R., Fazouane F., Belbraouet S., Bellal M.M., (2009)**. Purification et caractérisation électrophoretique d'une protéase coagulant le lait de *MucorPusillus* : comparaison de méthodes. *European Journal of Scientific Research*, 35 (4):512-52.

O

- **Otani H., Iwagaki M., Hosono A., (1991).** The screening of trees having milk clotting activity. *Animal Science and Technology*, 62, 417-423.
- **Özer, B., Akardere, E., Çelem, E. B., & Önal, S. (2010).** Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. *Biochemical Engineering Journal*, 50(3), 110-115.

P

- **Patel R and Reuter H (1986)** Effect of sodium, calcium and phosphate on properties of rennet coagulated milk. *Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie= Food science+ technology*.
- **Paul L.H. McSweeney, P. F. F., Paul D. Cotter and David W. Everett. (2017).** *Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. 1). New York, NY: Springer New York, NY.

R

- **Ramet J. P., and Weber F. (1980).** Contribution à l'étude de l'influence des facteurs de milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le lait*, 60(591-592) :1-13.
- **Ramet J.P., (1985).** La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéens. Ed. Etude FAO. Production et santé animale, 187 P.
- **Ramet, J.P., (1997).** Les agents de transformation du lait ; la présure et les enzymes coagulantes In : *Le fromage*. Ed., A. Eck, 3ème ed, Technique et documentation Lavoisier, p.101-107, 539p.
- **Rao, M. B., A. M. Tanksale, et al., (1998).** "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3): 597-635.
- **Remeuf F. et al., (1991).** Relations entre les caractères physico-chimiques des laits et leur aptitude fromagère. *Lait*, 71(4), 397-421
- **Robitaille, G., Lapointe, C., Leclerc, D., & Britten, M. (2012).** Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropéptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. *Journal of dairy science*, 95(1), 1-8.
- **Roseiro L.B., Barbosa M., M Ames J., Wilbey R.A., (2003).** Cheese making with vegetable coagulants the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 76-85.

- **Rossano, Rocco, Marilena Larocca, And Paolo Riccio (2011).** “Digestive Enzymes Of The Crustaceans Munida And Their Application In Cheese Manufacturing : A Review” *Marine Drugs* 9, No.7 : 1220-31.

S

- **Schmidt D.G. (1980).** Colloidal aspects of casein. *Neth. Milk Dairy J.* 34 – 42
- **Schmidt D.G., (1982)** Association of caseins and casein micelle structure In: *Developments of dairy chemistry1-proteins.* Ed., P. F. Fox, Applied science publishers TD, p. 61-86.
- **SELIN A., Demete, Çağım A.Ç., Hasan V., Asliye K., Mehmet K. (2018).** Effect of oryctolagus cuniculus (rabbit) rennet on the texture, rheology, and sensory properties of white cheese. *Food sciences and nutrition*, 6(4), p.p.1100-1108.
- **Sholeh MM, Ambarsari L, Nurcholis W, Nurhayati T (2019).** Characterization of ammonium sulphate fraction of pepsin from fish stomach. *Earth and Environmental Science*, 404: 1-6.
- **Shrestha, N. K., & Maskey, B. (2020).** Optimization of Crude Papaya (*Carica papaya*) Protease in Soft-Unripened Cheese Preparation. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, 12(12), 1-8. doi: 10.3126/jfstn.v12i12.30139
- **Siar H., (2014).** Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait. Mémoire de magister, Sciences Alimentaires option: Technologies Alimentaires : Université Constantine -1- Institut de la Nutrition, de l’Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A), 75 pages.
- **silva, B. L., Geraldés, F. M., Murari, C. S., Gomes, E., & Da-Silva, R. (2014).** Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Appl Biochem Biotechnol*, 172(4), 1999-2011. doi: 10.1007/s12010-013-0655-7
- **Slamani R. (2004).** Optimisation d’une méthode d’extraction de la pepsine ovine. Essai de purification et caractérisation. Mémoire Magister. Sciences Agronomiques. INA.El-Harrach, 113 p.
- **SLAMANI R.(2018).** Obtention et caractérisation d’une pepsine ovine; aptitude a la coagulation du lait. These doctorat en science agronomique. Ecole national supérieure agronomique. El harrach, alger. 111p.

Références bibliographique

- **Storry JE, Grandison AS, Millard D, Owen AJ and Ford GD (1983)** Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research* 50:215-229.

T

- **THOMAS Croguennec, JEANTET Romain, BRULÉ Gérard. (2020).** Fondement physicochimiques de la technologie laitière (Editions Tec Doc Lavoisier.). Saint-Denis. France 154p.
- **Tervalo H-L, Antila V and Syväjärvi J (1986)** Factors affecting the renneting properties of milk.
- **Thirukumaran J. A. Moses, and C. Anandharamakrishnan (2022).** "Resource Recovery from Fish Waste: Prospects and the Usage of Intensified Extraction Technologies." *Chemosphere* 299 (2022/07/01): 134361., R., Vijay Kumar Anu Priya, Srinivasan Krishnamoorthy, Paranthaman Ramakrishnan,

W

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

Z

- **Zhao L, M Budge S, E Ghaly A, S Brooks M (2011).** Extraction, Purification and Characterization of Fish Pepsin: A Critical Review. *Journal of Food Processing & Technology*, 2 (6): 1-14.

Site web:

- (Anonyme 1): https://www.ons.dz/IMG/pdf/Activite_annee_2012_.pdf (consulté le 13 avril 2023 à 11:50).

Annexe

Annexe I :appareillage :

Appareillage utilisé au laboratoire :

- Bain marie
- Centrifugeuse
- pH mètre
- Agitateur magnétique
- Spectrophotomètre
- Mixeur
- Eppendorfs
- Différentes verreries (tubes à essai, tubes a centrifugeuse, bécher, fioles jaugées)
- Micropipettes
- Vortex
- Etuve

Annexe II : Colorants et réactif :

- **Colorants :**
 - tyrosine
 - bleu de coomassie G-250,
 - TCA 10%,
 - réactif de folin ciocalteu dilué ½.
 - tartrate de sodium-potassium.
- **Réactifs :**
 - Caséine
 - Chlorure de calcium.
 - Sérum albumine bovine (BSA).
 - poudre de lait 0% et 26 % de matière grasse.
 - acétate de sodium

Annexe III : préparation solutions :**➤ Préparation de :****• tampon Tris-HCL 10mM / pH 8:**

Pour la préparation de 1 litre de tampon selon (Sambrook et Russel 2001) il faut :

- Peser 1.21g de tris base dans 800ml d'eau distillée
- Ajouter de l'acide chlorhydrique concentré (37%) jusqu'à atteindre le pH 8
- Ajouter à peu près 200ml afin d'atteindre 1 litre
 - Sachant que M tris = 121.1g/mol :

$$M = M \times \text{molarité} \times V_f.$$

• tampon acétate :

-Peser 1.64g d'acétate de sodium

-Homogénéisation dans 100ml d'eau distillée

-Ajustement pH avec NaOH et acide acétique jusqu'à atteindre pH 5.5.

• Caséine 0.5% :

Peser 0.5g et homogénéiser dans 100 ml d'eau distillée

• Solution A :

La solution A est préparée en mélangeant 1 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 5g de carbonate de sodium (Na₂CO₃) dans 250mL d'eau distillée.

• Solution B :

La solution B est préparée en mélangeant 0.1 g de tartrate sodium-potassium (C₄H₄KNaO₆) et 0.032 g de sulfate de cuivre CuSO₄ dans 10mL d'eau distillée.

• Solution C :

La solution C est préparée en mélangeant un volume de 100mL de la solution A avec un volume de 2mL de la solution B.

• TCA 10% :

Peser 10g d'acide trichlore acétique et homogénéiser dans 100ml d'eau distillée.

• Folin :

Afin d'obtenir le folin 1/2 on mélange 25ml folin concentré dans 25ml d'eau distillée.

- **Réactif de Bradford :**

Pour préparer 500ml du réactif de Bradford on pèse 50mg du bleu de coumassie G-250 + 25ml d'éthanol + 50ml d'acide phosphorique. (H₃PO₄).

Annexe IV :

1)- courbe d'étalonnage de la BSA :

La gamme d'étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) (1mg/ml) avec les quantités suivantes : 1 / 25 : 20ul d'enzyme + 480ul tampon pour un tube a essai et le blanc est 500ul de tampon. Pour 6 tubes a savoir : le blanc, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1. Toutes les dilutions sont effectuées avec de l'eau distillée. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 500ml. Après addition de 2ml du réactif de Bradford et agitation et laisser pendant 20min a l'obscurité.

Tube	Blanc	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Quantité de la BSA (ul)	0	200	400	600	800	1000
Quantité d'eau distillée (ul)	1000	800	600	400	200	0
Total en ul	1000					
Solution de BSA (ul)	500					
Réactif Bradford	2000					

Les résultats obtenus après mesure de l'absorbance à 595nm sont représentés dans le graphe ci-dessous :

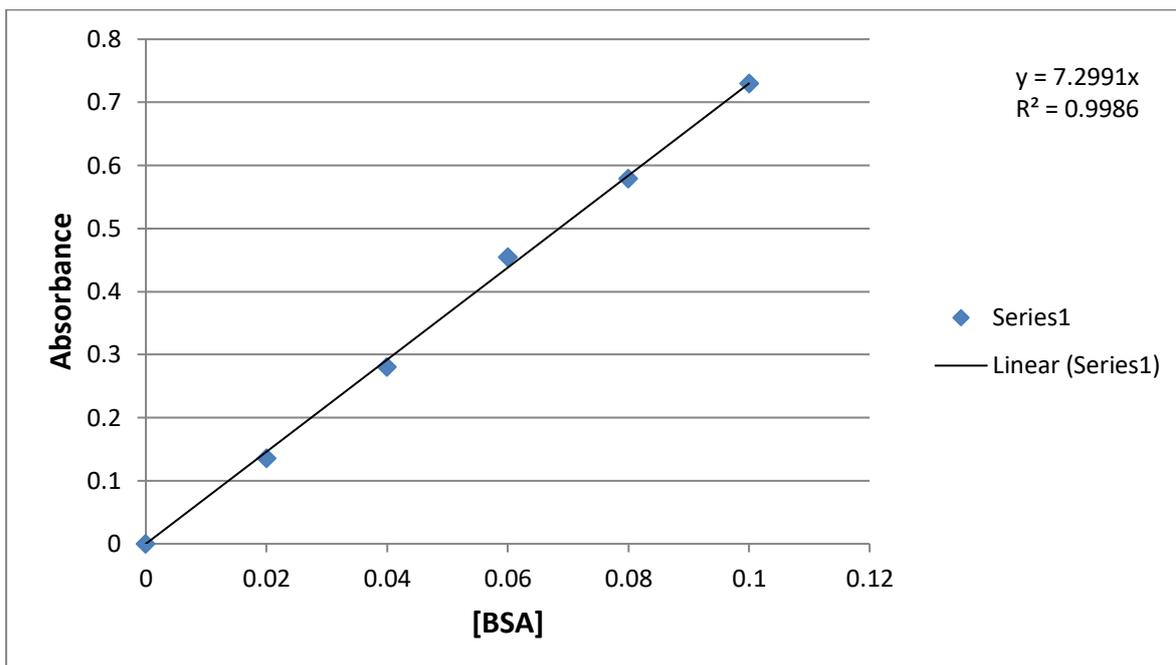


Figure 1 : courbe d'étalonnage de la BSA 1mg/1ml, Bradford (1976)

Annexe V :

courbe d'étalonnage de la TYROSINE :

Elle est utilisée en référence afin de calculer l'activité protéolytique, avec une dilution de $\frac{1}{2}$

tube	blanc	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Quantité de Tyrosine (ul)	0	800	600	400	200	0
Quantité de Tampon ajoutée (ul)	1000	200	400	600	800	1000
Solution C ajouté (ul)				2000ul		
Incubation 10min / 35c						
Folin (ul)				250ul		

Après agitation et incubation pendant 20min a 35c, on mesure l'absorbance a 660nm.
Les résultats obtenus sont représentés dans le graphe :

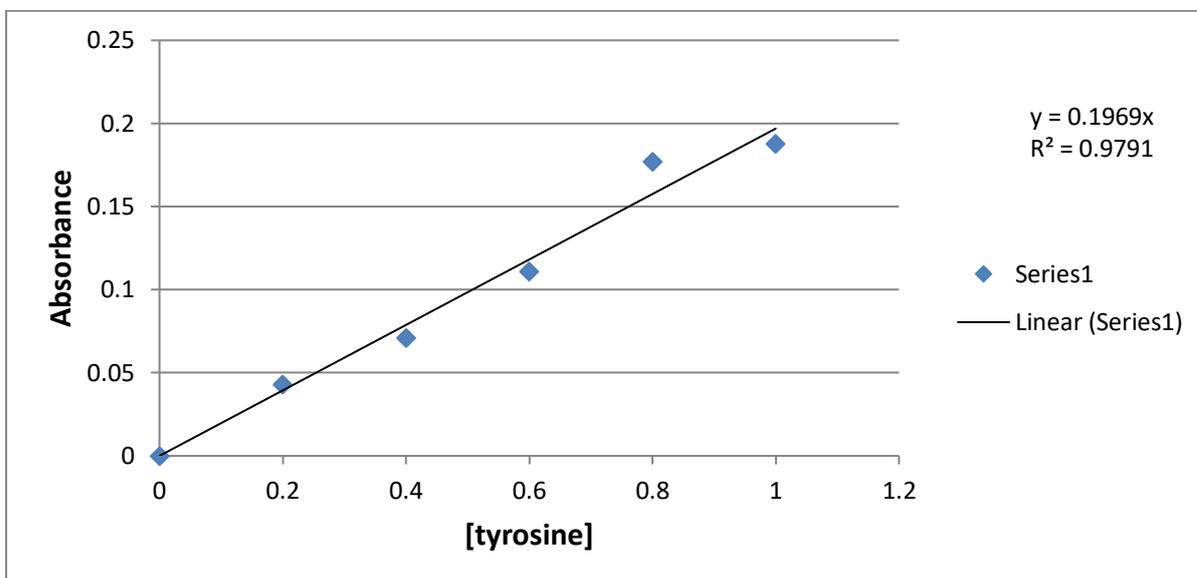


Figure 2 : courbe d'étalonnage de la tyrosine, (activité protéolytique).

Annexe VI : questionnaire de l'analyse sensorielle

Questionnaire d'analyse sensorielle hédonique d'un fromage frais

Sexe : M Ou F

Age :

N° Du Poste :

Date :

3 échantillons de fromage frais codés vous sont présentés, il vous est demandé d'évaluer les différentes caractéristiques organoleptiques en attribuant une note entre 1 et 5 selon l'échelle présentée.

Appréciez-vous la couleur ?

- 1-Non Appréciee
- 2-Peu Appréciee
- 3-Moyennement Appréciee
- 4-Bien Appréciee
- 5-Très Appréciee

échantillon	A	B	C
note			

Appréciez-vous l'odeur ?

- 1-Non Appréciee
- 2-Peu Appréciee
- 3-Moyennement Appréciee
- 4-Bien Appréciee
- 5-Très Appréciee

échantillon	A	B	C
note			

Couleur :

- 1-foncé
- 2-moyen
- 3-clair
- 4-blanc
- 5-jaune

échantillon	A	B	C
note			

Texture :

- 1-très granuleux
- 2-granuleuse
- 3-moyenne
- 4-lisse
- 5-très lisse

échantillon	A	B	C
note			

D-Arrière Gout :

- 1-très fort
- 2-fort
- 3-moyen
- 4-faible
- 5-absent

échantillon	A	B	C
note			

Préférences :

Classez selon l'ordre de préférence les échantillons (A, B, C) en leur attribuant une note de 1 a 9 sachant que 1 correspond au moins préféré et 9 au plus préféré comme présenté dans l'échelle ci-dessous :

- 1-Extrêmement Désagréable
- 2-Très Désagréable
- 3-Assez Désagréable
- 4-Désagréable
- 5-Ni Agréable Ni Désagréable
- 6-Assez Agréable
- 7-Agréable
- 8-Très Agréables
- 9-Extrêmement Agréable

échantillon	A	B	C
note			

Entourer les caractéristiques qui ont motivé votre préférence :

- 1- La couleur
- 2- L'odeur
- 3- La texture
- 4- Le gout
- 5- Le tout
- 6- Autre :.....

Merci pour votre coopération

Résumé

Ce travail a pour objectif la recherche et l'identification de succédanés de présure d'origine animale (poissons), particulièrement chez les espèces de *Sardina Pilchardus* et de *Dasyastis Pastinaca* qui sont des espèces pélagiques très réponsées dans toute la Méditerranée notamment en Algérie présentant un grand intérêt économique et sociale.

Afin de procéder à cette étude, la caractérisation physico-chimique des extraits bruts (obtenus à partir de ces deux espèces) a été effectuée, à savoir la mesure de la teneur en protéines, ainsi que l'évaluation des activités protéolytique et coagulante. Notamment, l'étude des paramètres influençant l'activité enzymatiques de nos extraits (le potentiel d'hydrogène, la température, la concentration en enzyme et concentration en CaCl₂).

D'après les résultats obtenus, l'activité protéolytique de la *Sardina Pilchardus* est d'ordre de 0.18 ug/ml.min ainsi qu'une valeur de 21.4 ug/ml.min concernant la *Dasyastis pastinaca*. Cependant l'activité coagulante est de 24.34 unité soxhlet et de 18.11 unité soxhlet pour nos extraits de la *Sardina Pilchardus* et *Dasyastis Pastinaca* respectivement. L'élaboration du fromage nous a confirmé les résultats obtenus.

On en conclue donc que la pepsine obtenue à partir des viscères de poisson peut être utilisées dans la coagulation du lait en tant que succédanés de la présure.

Mots clés : Dosage des protéines, activité protéolytique, activité coagulante, pepsine, présure, fromage, lait, coagulation.

Abstract

The aim of this work is to research and identify rennet substitutes of animal origin (fish), particularly in the *Sardina Pilchardus* and *Dasyastis Pastinaca* species, which are pelagic and highly sought-after throughout the Mediterranean, particularly in Algeria, and are of great economic and social interest.

In order to carry out this study, the physico-chemical characterization of the crude extracts obtained from these two species was carried out, such as the measurement of protein content, as well as the evaluation of proteolytic and clotting activities. In addition, the parameters influencing the enzymatic activity of our extracts (pH, temperature, enzyme concentration and CaCl₂ concentration) were studied.

According to the results obtained, the proteolytic activity of *Sardina Pilchardus* is of the order of 0.18 ug/ml.min, and a value of 21.4 ug/ml.min for *Dasyastis pastinaca*. However, the coagulant activity is 24.34 US and 18.11 US for our *Sardina Pilchardus* and *Dasyastis Pastinaca* extracts respectively. Cheese production confirmed these results.

We therefore conclude that pepsin obtained from fish viscera can be used in milk clotting as a substitute for rennet.

Key words: Protein assay, proteolytic activity, clotting activity, pepsin, rennet, cheese, milk, clotting.