

Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Caractérisation de l'extrait pepsique
coagulant le lait obtenu à partir des
proventricules de poulet**

Présenté par :

MESSAOUDI Syla & TABOURI Wassila

Soutenu le : 01 Juillet 2019

Devant le jury composé de :

Mme.YAHIAOUI H.	MAA	Président
Melle.BELHAMICHE N.	MAA	Encadreur
Mme.BOUDRIES S.	MAA	Examineur
M.BOUKHALFA F.	MCB	Co-encadreur

Année universitaire : 2018 / 2019

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience pour accomplir ce modeste travail.

Qu'il nous soit permis d'exprimer notre reconnaissance à notre enseignante et promotrice, Mlle. BELHAMICHE N., pour avoir accepté de diriger ce travail. Nous la remercions également pour la confiance qu'elle nous a témoignée. Qu'elle veuille trouver ici notre estime, notre gratitude et notre respect. Il nous est agréable d'exprimer nos sincères remerciements

à Mr. BOUKHALFA F., notre co-promoteur, pour son aide précieuse et ses encouragements. Ses qualités humaines et morales nous ont aidées à mener à terme ce travail,

Notre profond respect va à notre enseignante, Mme. YAHIAOUI H., pour avoir accepté de présider le jury et d'apprécier la qualité de notre travail.

Nous tenons à remercier Mme. BOUDRIES S., pour avoir accepté de porter un jugement éclairé et d'examiner notre travail.

Nous exprimons notre reconnaissance à Mlle. MENNAS B., Ingénieur du laboratoire du Génie Biologique pour sa disponibilité à tout moment sans oublier Mlle. TABET S., ingénieur du laboratoire de Mycologie, pour son aide.

Toute notre reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à la réalisation de notre mémoire.

Nos remerciements vont également à tous nos amis qui, à diverses reprises, ont manifesté leur soutien et leurs amitiés .

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A mes chers parents avec tous mes sentiments de respect, d'amour, de gratitude et de reconnaissance pour tous leurs sacrifices déployés pour m'élever dignement et assurer mon éducation dans les meilleures conditions, pour leur tendresse, leurs amour, leur soutien tout au long de ma vie.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués et le fruit de votre soutien infailible !

A mes chères sœurs Lamia, Sonia et Thinhinane pour leurs encouragements permanant et leurs soutien moral.

A mes chers frères que j'aime profondément.

A mes chères copines, Maha, Taous, Laila, Lamia, Lyly et Sabrina, avec qui j'ai partagé de bons moments durant la période de travail.

Sylia

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

En premier lieu à vous mes très chers parents, aucun mot. Aucune dédicace ne peut exprimer ma considération pour l'amour éternel et les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être.

A mes très chers frères Abd el-rzak et Yahia et A ma belle sœur Nadia.

A mes chères sœurs Hakima et Latifa et leurs maris.

A toutes mes amies Sonia, Laila, Zikrouch, Rania, Lamia, Saida, Rosa, Fahima, Sylia, Karima, Sassa, Tita, Siham, Nina et Nadia.

Wassila



SOMMAIRE

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

<i>Introduction</i>	1
---------------------------	---

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le lait	3
1. Définition	3
2. Caractères du lait	3
3. Composition globale du lait	3
4. Caséine du lait	5
5. Mécanisme de la coagulation de lait	6
5.1. Coagulation enzymatique	7
5.2. Coagulation acide	9
5.3. Coagulation mixte	9
II. Protéase coagulantes des industries laitières.....	9
1. Présure	9
1.1. Historique	9
1.2. Définition	10
1.3. Propriétés	10
2. Succédanés de présure	11
2.1. Succédanés de présure d'origine végétale	11
2.2. Succédanés de présure d'origine microbienne	12
2.3. Succédanés de présure d'origine animale	13

Matériel et méthodes

I. Matériel	16
1. Lait	16
2. Présure	16
II. Méthodes	16

1.Préparation des proventricules	16
2. Obtention (extraction) de l'extrait pepsique.....	17
3. Etude de l'extrait enzymatique coagulant le lait	19
3.1. Mesure de l'activité coagulante.....	19
3.2. Mesure de l'activité protéolytique	19
3.3.Dosage des protéines	20
4. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut	20
4.1. Détermination de la température optimale d'activité	20
4.2. Influence de pH du lait	20
4.3. Détermination de la concentration optimale de CaCl ₂	20
4.4. Influence de la concentration en extrait enzymatique	21
5. Influence de la concentration en extrait enzymatique	21
5.1. Stabilité thermique	21
5.2. Stabilité au cours de la conservation	21

Résultats et discussion

1. Rendement d'extraction et caractéristiques de l'extrait coagulant brut.....	22
1.1. Rendement de l'extraction de la pepsine	22
1.2. Caractéristiques de l'extrait coagulant brut	22
2.Activité protéolytique des extraits coagulants	23
3. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut	24
3.1. Influence de la température sur l'activité coagulante	24
3.2. Influence du pH du lait sur l'activité coagulane	25
3.3. Influence de la concentration de CaCl ₂ du lait sur l'activité coagulante	28
3.4. Influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante	29
4. Etude de la stabilité.....	30
4.1. Stabilité thermique	30
4.2. Stabilité a la conservation à 4°C et à - 20 °C.....	31

Conclusion 33

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

BSA : Bovin Serum Albumin .

FAO : Organisation des Nation Unies .

FIL : Fédération Internationale du lait .

J.O.R.A : Journal Officiel de la République Algérienne .

ONS : Office National des Statistique.

TCA : Trichloracétic Acid.

CMP : Caséinomacropéptide .

UP : Unité de présure .

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Modèle de formation des micelles selon Schmidt (Ramet, 1990).	7
2	Phases de coagulation enzymatique du lait (Alais, 1984).	8
3	Appareil digestif du poulet.	14
4	Photographie de la forme externe.	16
5	Photographies des principales étapes d'extraction de la pepsine du poulet.	17
6	Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet selon Bohak (1970).	18
7	Quantités des produits d'hydrolyse libérés par les extraits enzymatiques étudiés.	23
8	Effet de la température du lait sur l'activité coagulante.	24
9	Effet de pH du lait sur l'activité coagulante.	26
10	Effet de la concentration de CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante.	28
11	Effet de la concentration des extraits sur les activités coagulantes.	29
12	Effet Stabilité thermique de l'extrait brut et de la présure.	30
13	Stabilité de l'extrait pepsique au cours de la conservation.	32

Liste des figures en annexe

Figure	Titre
1	Mesure du temps de coagulation par la méthode de Berridge (1945) modifiée par Collin et <i>al.</i> (1977).
2	Courbe étalon de la Tyrosine
3	Courbe étalon de la B.S.A.

Liste des Tableaux

Tableaux	Titre	page
I	Composition globale du lait de vache (Filion, 2006).	4
II	La composition moyenne des laits de différentes espèces animales (Mahaut et al., 2000).	5



INTRODUCTION

Le lait est un produit noble et vital durant les premiers mois de vie des mammifères. C'est un aliment universel, présent dans toutes les civilisations. Il possède une grande valeur nutritionnelle. Cependant, du fait de son instabilité biologique et physico-chimique, il constitue un aliment facilement altérable ceci constitue un facteur limitant de son utilisation en l'état. C'est dans ce contexte que sont apparues, il y a plusieurs millénaires les premières transformations fromagères.

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

La coagulation du lait est l'étape clé de la fabrication d'un fromage. Selon Eck et Ghili (2006), elle consiste à la formation d'un gel suite à des modifications physico-chimiques intervenant sur les micelles de caséines.

La présure de veau, qui renferme essentiellement de la chymosine, constitue l'agent coagulant le plus utilisé dans la coagulation enzymatique du lait (Scott, 1981). Toutefois, son extraction demanderait des sacrifices trop onéreux. En effet, la présure nécessite la récupération, après l'abattage, des caillottes de veaux non sevrés ; ceci affecte lourdement les coûts par la faiblesse du rendement en viande.

L'augmentation de la production fromagère impose une utilisation croissante d'enzyme de coagulation qu'il n'est pas possible d'obtenir par le seul traitement des présures, car la production de veaux de lait est fluctuante.

Cette crise d'approvisionnement de la présure animale a incité de nombreux chercheurs et firmes à exploiter d'autres sources potentielles de coagulases capables de remplacer la présure traditionnelle (Alias, 1968).

Les protéases d'origine végétale sont les succédanés les plus anciens employés dans des préparations traditionnelles telles que celles provenant du gaillet, de l'artichaut, du chardon (*Cynara cardunculus*) (Mozali, 1997), ou la ficine du latex du figuier (*Ficus caricas*) et la papaine. Pour pallier le déficit en présure, d'autres enzymes ont été envisagées telles que les protéases d'origine fongique synthétisées par *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* et *Endothia parasitica* ; et d'origine bactérienne provenant du genre *Bacillus* (Ramet, 1985 ; Andren, 2002).

D'autre part, on rencontre des succédanés d'origine animale tels que les pepsines ovine, bovines, porcines, maritime et la pepsine extraite des proventricules de volailles telle que le canard.

Toute fois, le choix d'un succédané de présure ne repose pas seulement sur l'activité coagulante, mais aussi sur son activité protéolytique non spécifique, dans les conditions de pH et de température qui se présentent en fromagerie (Alias, 1968). De plus, une enzyme de remplacement doit aussi répondre à trois critères principale, à savoir ; l'absence de la toxicité , obtention d'un produit fromager comparable à celui préparé avec la présure animale et présent un prix de revient moins élevé à celui de la présure.

La production de l'industrie fromagère en Algérie est passée de 20 000 tonnes en 2006 à 30 000 tonnes en 2011 avec une consommation moyenne de 0,6 Kg/habitant/an en 2006 à 0,7 Kg/habitant/an en 2011 (ONS, 2012).

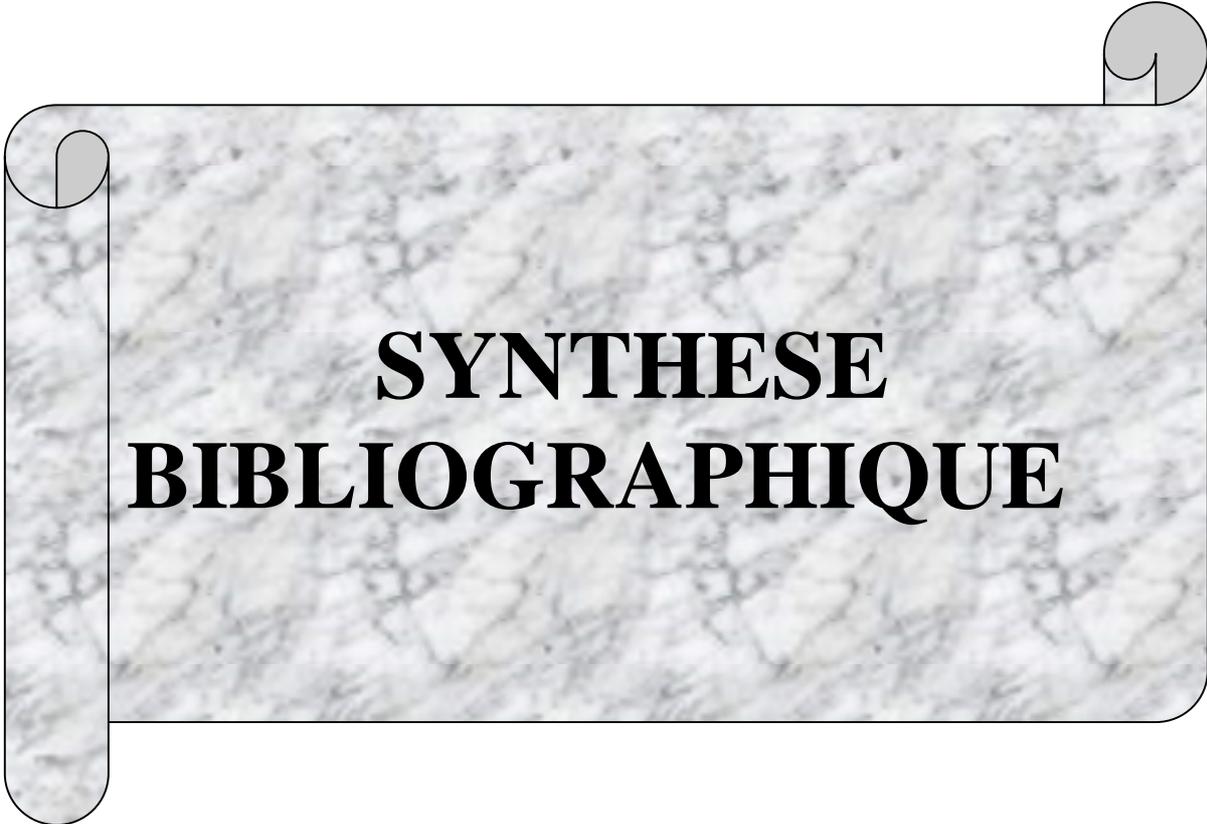
En outre, l'importation totale de la présure traditionnelle ou de ses succédanés d'origine microbienne est d'environ 1,5 tonne par an. Cette quantité coûte approximativement 102 000 dollars, somme équivalente à 7,5 millions de DA (ONS, 2012).

De plus, la production du poulet de chair en Algérie est passée de 201 000 en 2005 à 251 000 tonnes en 2011 suivant les statistiques présentées par FAO (2013). Par conséquence, des quantités énormes des viscères non comestibles restent un fardeau sur l'environnement. De ce fait l'utilisation de proventricule de poulet pour reconstituer la présure est une voie de valorisation des coproduit d'abattage avicole.

L'objectif de notre travail consiste en la contribution à l'étude d'un extrait de remplacement de la présure, obtenu à partir de proventricule de poulet *Gallus gallus*.

Cette étude comprend deux parties :

- 1- Obtention de l'extrait pepsique à partir des proventricules de poulet.
- 2- Caractérisation partielle de l'extrait coagulant brut par comparaison à la présure.



**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

I. Généralités sur le lait

1. Définition

Selon le premier Congrès International de la Répression des Fraudes Alimentaires à Genève (1908), le lait est le produit intégral de la traite complète et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli selon les règles de l'hygiène et ne pas contenir de colostrum.

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

2. Caractères du lait

Le lait est un liquide de couleur blanche, caractérisé par sa faible odeur mais identifiable et sa douce saveur faiblement sucrée. C'est un mélange multiphasique constitué de trois phases :

- le lactosérum ; une phase aqueuse dont les constituants majeurs sont le lactose et un ensemble de protéines globulaires ;
- une phase dispersée de nature lipidique sous forme globulaire ;
- une phase de nature protéique (micelles de caséines).

3. Composition globale du lait

L'eau, le lactose, les protéines, la matière grasse et les sels ou les cendre constituent les principaux constituants du lait. Ce dernier contient également, selon Huppertz et *al.*(2006), des constituants mineurs tels que les vitamines et les enzymes.

Les teneurs moyennes de constituants majeurs du lait de Vache sont présentées dans le tableau I.

Tableau I. Composition globale du lait de vache (Filion, 2006)

Constituants	Teneur du lait en ses Constituants en g/l
Constituants minéraux	
Eau	902
Constituants salins minéraux	6.9
Gaz dissous	0.1
Constituants organique	
Constituants salin	1.7
Lactose	49
Matière grasse	38
Constituants azotés protéiques	
Protéine	32
Caséine	26
Protéine solubles	6
Constituants azotés non protéiques	1.5

Outre sa complexité et son hétérogénéité, le lait présente une grande variabilité dans sa composition avec la race, l'espèce, l'individu, la saison et l'alimentation de l'animal (Martin et Coulon, 1995).

La composition moyenne des principaux constituants des divers types de lait, selon Mahaut et al.(2000), est indiquée dans le tableau II.

En général, les laits de vache, de chèvre et de chamelle présentent des compositions les plus équilibrées en lipide, lactose, caséines et protéines. Les espèces à croissance néonatale rapide comme la truie et la renne sont caractérisées par des laits riches en protéines et en sels minéraux. En revanche, le lait des animaux marins vivants en climat froid comme la baleine bleue, otarie et renne est plus riche en matières grasses. Le lait des espèces à développement cérébral important comme la femme et la jument sont riche en lactose.

Tableau II. Composition moyenne des laits de différentes espèces animales (Mahaut et al., 2000)

		Matière sèche	Matière grasse	Protéines	Caséines	Lactose	Cendres
Lait humain		12.6	3.75	1.6	28	7	0.21
Ruminants	Vache	12.5	4.1	3.6	78	5	0.71
	chèvre	13	4.2	3.5	75	4.3	0.86
	brebis	19.3	7.9	5.2	77	4.8	0.9
	bufflesse	17.9	8	4.2	80	4.9	0.78
	Renne	36.7	22.5	10.3	80	2.5	1.44
	chamelle	13.6	4.5	3.5	28	5	
Equidés	Jument	11	1.6	2.7	50	6.1	0.51
	ânesse	11	2.5	2	45	6.1	
Suidés	Truie	18.3	6	6	50	5.4	0.9
Mammifère marins	Baleine bleue	55	42.3	10.9	66	1.3	
	Otarie	62.3	53.3	8.9	52	0.1	

4. Caséines du lait

Les caséines forment près de 80 % des protéines du lait et se regroupent sous une forme sphérique appelée micelle (Alais, 1974 ; Ribadeau-Dumas, 1991 ; Mathieu 1998). Les caséines du lait ont la caractéristique essentielle de précipiter à pH 4,65 à température ambiante et de ne pas être insolubilisée par le chauffage à 100°C. Les quatre types de caséines n'ont ni les mêmes propriétés physico-chimiques, ni les mêmes masses moléculaires (Terrien et Fournier, 1998).

La micelle de caséine est une particule sphérique de taille variant de 100 à 500 nm avec un diamètre moyen de 180 nm (Alais, 1974 ; Amiot et al., 2002). Elle est constituée de l'association des caséines α_1 , α_2 , β , κ et de quelques fragments peptidiques (les caséines γ), issus de la protéolyse de la caséine β , et de composants salins dont le calcium et le phosphate (Brule et Lenoir, 1990). La micelle est caractérisée par un poids moléculaire moyen de l'ordre de 108 Da et renferme entre 20 000 et 150 000 molécules de caséine.

La stabilité des micelles de caséine dépend de deux facteurs. D'une part, leur charge électrique dans le lait frais est fortement négative ce qui maintient leur dispersion. D'autre part, le degré d'hydratation des micelles est élevé grâce aux parties hydrophiles des caséines, qui fixent une grande quantité d'eau.

Plusieurs modèles ont été proposés. Les uns accordent à la micelle une structure globale avec une répartition non uniforme des constituants. D'autres, retiennent l'idée d'une structure avec submicelles. Les hypothèses les plus admises sont celles de Schmidt (1982).

Selon le modèle de Schmidt, la micelle serait constituée d'un ensemble de sous-unités, de nature exclusivement protéique et de composition variable, associées les unes aux autres par les éléments minéraux (calcium, magnésium et phosphate). Cette association est favorisée par la présence des sites phosphoséryles localisés à la surface des submicelles ; ceux-ci présentent une très grande affinité vis-à-vis du calcium et du phosphate de calcium colloïdal. La structure de ces submicelles n'est pas uniforme ; elles sont composées d'un cœur hydrophobe, formé par les parties apolaires des caséines, et d'une enveloppe de nature polaire, formée des segments de chaînes hautement chargés avec, d'une part, les résidus phosphoséryles des caséines α_{s1} , α_{s2} et β et, d'autre part, la partie C-terminale de la caséine κ . Ces submicelles sont organisées de telle manière que les pôles hydrophobes **lient** à l'intermédiaire du calcium et du phosphate minéral. La croissance des micelles s'arrête lorsque la surface externe est occupée par les groupements hydrophiles. Le modèle de formation des micelles est illustré dans la figure 01.

5. Mécanisme de la coagulation de lait

La coagulation du lait, en industrie fromagère, est une étape essentielle qui nécessite l'emploi d'un agent coagulant. Elle peut être obtenue soit par abaissement du pH et/ou par addition de la présure. Bien qu'issus de mécanismes très différents, les deux voies de coagulation aboutissent à la formation d'un coagulum résultant de la déstabilisation de l'état micellaire originel de la caséine. Cette dernière, associée à des minéraux, forme un réseau tridimensionnel spécifique du mode de la coagulation appliqué, donnant soit un gel lactique soit un gel présure.

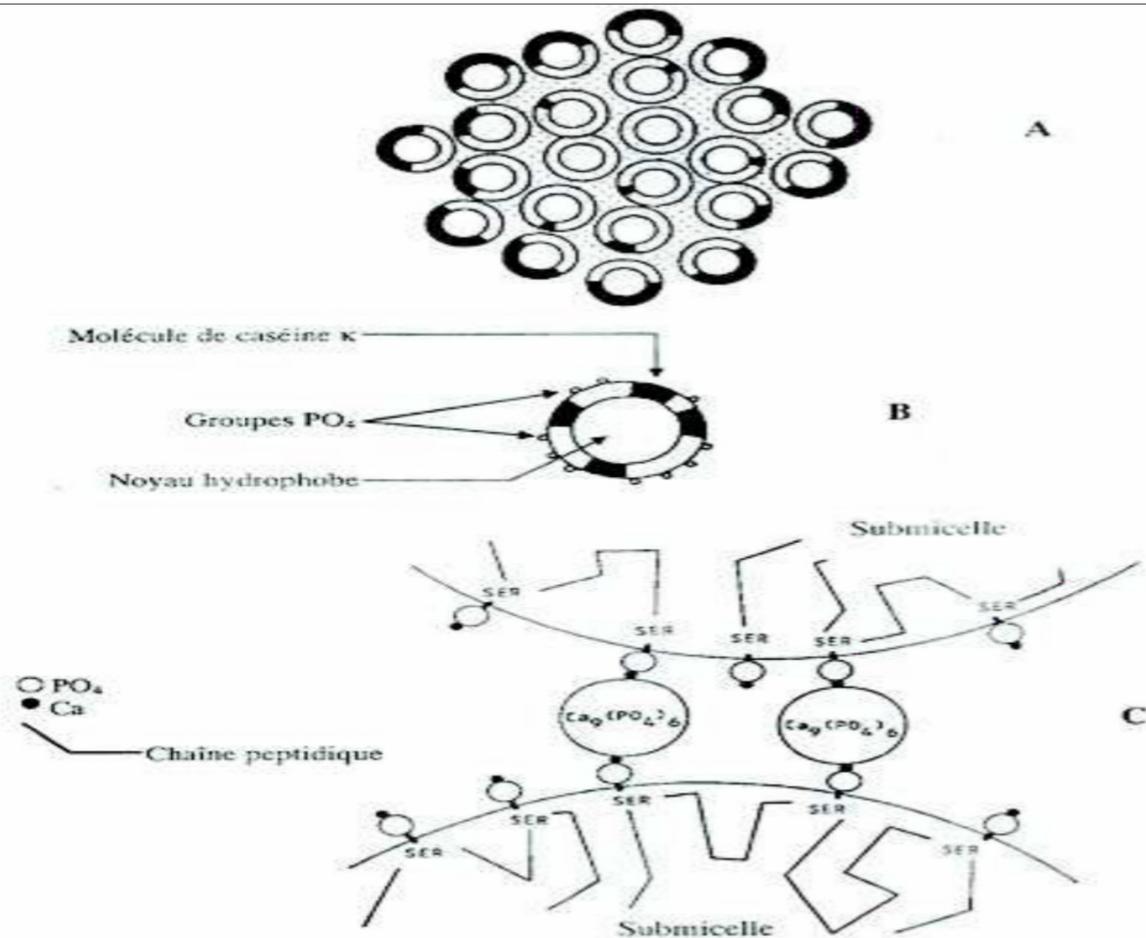


Figure 01 : Modèle de formation des micelles selon Schmidt (Ramet, 1990)
 A : micelle, B : submicelle, C : pontage de deux submicelles

5.1. Coagulation enzymatique

La coagulation du lait par des enzymes protéolytiques est une des plus anciennes opérations de transformation alimentaire. Un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou microbienne, présente la propriété de coaguler le complexe caséinique (Dalglish, 1993). La présure, est l'enzyme coagulante la mieux connue et son mode d'action résulte d'un processus en trois phases (Alais, 1984 ; Brule et *al.*, 1997, Mahaut et *al.*, 2000 ; Lucey, 2002) :

- **phase primaire ou enzymatique** qui correspond à une attaque de l'enzyme sur la caséine κ (composante qui stabilise la micelle) au niveau de la liaison Phe105-Met106. La chaîne peptidique se trouve ainsi coupée en deux segments, le segment 1-105 est la paracaséine-κ et le segment 106-169 qui est le caséinomacropeptide (CMP). La

paracaséine-κ liée aux caséines α et β reste intégrée à la micelle hydrophobe et le CMP contenant tous les glucides est libéré dans le lactosérum. Ce qui entraîne une réduction de la charge négative et leurs degrés d'hydratation (Lucey, 2002; Mahaut *et al.*, 2003).

- **phase secondaire ou phase d'agrégation des micelles déstabilisées** qui commence dès que 85% de la caséine-κ est hydrolysée et durant laquelle la libération du macropeptide de la caséine-κ sous l'action de l'enzyme entraîne la réduction des répulsions électrostatiques entre les micelles de caséines hydrolysées. L'élimination de ces macropeptides entraîne également une réduction du diamètre hydrodynamique et une perte de la stabilité (Walstra *et al.*, 1981 ; Lucey *et al.*, 2003). Les micelles déstabilisées s'agrègent en présence des ions de calcium libres (Ca⁺⁺) (Dalglish et Holt, 1988). Au début, il ya formation de chaines linaires de micelles qui continuent de s'agréger pour former des amas. Ces derniers constituent le gel protéique qui se sépare nettement de lactosérum (Lucey, 2002).

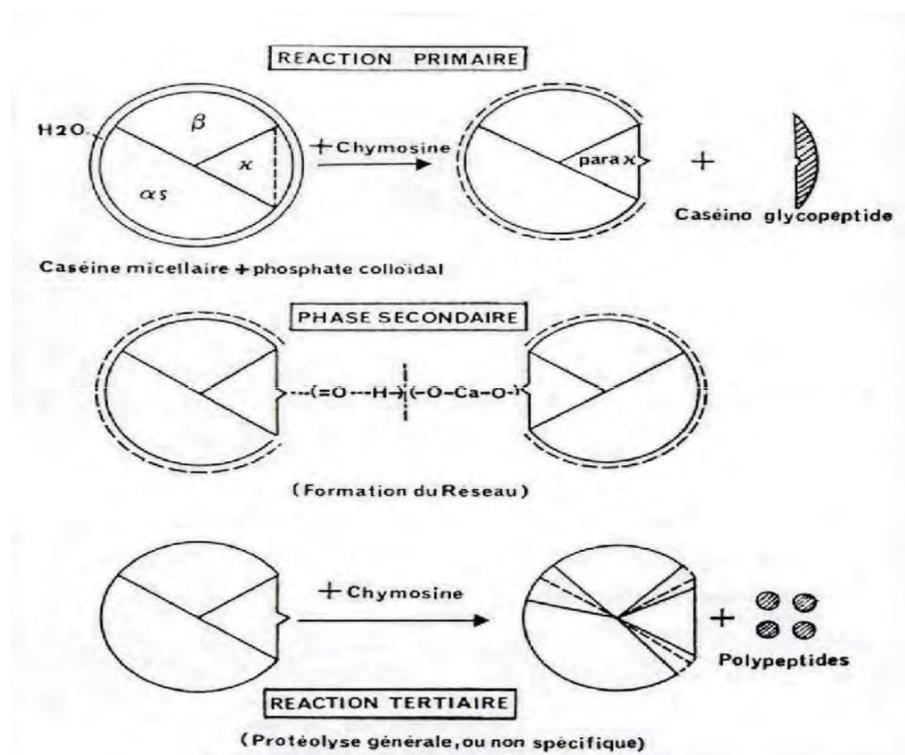


Figure 2 : Phases de coagulation enzymatique du lait (Alais, 1984)

- **phase tertiaire ou phase de réticulation** durant laquelle les micelles agrégées subissent une profonde réorganisation par la mise en place des liaisons phosphocalciques et peut être de ponts disulfures entre les para caséines (Mahaut et *al.*, 2002; Vignola, 2002).

5.2. Coagulation acide

Le lactose se transforme progressivement, sous l'action des bactéries lactiques, en acide lactique. Cette acidification du lait entraîne une neutralisation des charges négatives portées par les caséines et, par conséquent, une diminution du potentiel de surface des micelles. Il en résulte une solubilisation des éléments stabilisateurs des micelles (le phosphate de calcium) qui se désagrègent en submicelles.

Lorsque le pH est voisin de 5, la charge des submicelles est très réduite et la précipitation s'amorce (point isoélectrique de la caséine), la neutralisation des charges est complète ; les micelles des caséines flocculent et se soudent formant au repos un gel homogène qui emprisonne le lactosérum et occupe entièrement le volume du lait. Au cours de la déminéralisation du complexe phosphocaséinate de calcium, le calcium colloïdal migre dans le sérum.

Le gel lactique obtenu est perméable, friable, fragile et ne permettra qu'un égouttage limité.

5.3. Coagulation mixte

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

II. Protéases coagulantes des industries laitières

1. Présure

1.1. Historique

Il y a environ 7000 ans, le lait était transporté dans des sacs. Ces sacs, appelés outres, étaient fait avec l'estomac de certains animaux. Or, un voyageur de cette époque qui décida de se rafraîchir avec le lait qu'il transportait, eu la surprise de découvrir que le

lait s'était transformé en une substance semi-solide. Intrigué et affamé, il goûta le contenu de son outre et ne trouva pas ça mauvais du tout, il venait de découvrir le fromage.

Ainsi, nous savons depuis ce temps là qu'une substance contenue dans l'estomac des jeunes ruminants fait cailler le lait. En fait, cette substance s'appelle **la présure**.

1.2. Définition

Selon la Fédération Internationale du Lait (FIL), la dénomination présure est donnée à l'extrait coagulant provenant des caillettes de jeunes ruminants abattus avant sevrage (Ramet, 1985 ; Andren, 2002). Elle est traditionnellement à la base de la fabrication des fromages (Vierling, 2003).

1.3. Propriétés

La présure se compose de deux fractions, une partie majeure de chymosine (80%) et une partie mineure de pepsine (20%) (Scott, 1981 ; Huppertz et *al.*, 2006). La chymosine est la principale enzyme de coagulation du lait présente dans la présure. C'est une protéase acide, sécrétée sous forme pro-enzyme inactive appelée prochymosine. L'activation de cette dernière en chymosine se fait spontanément dans des caillettes aux pH inférieurs à 5,0 par hydrolyse de l'extrémité N-terminale de la molécule (Mahaut et *al.*, 2000 ; 2003). Elle est caractérisée par un poids moléculaire de 35 KDa avec 323 résidus d'acide aminés (Scriban, 1988).

Comme la pepsine, la chymosine est une protéase acide à aspartate. Son poids moléculaire est de 30 700 Da. Selon Foltmann (1979), la chymosine est constituée d'une seule chaîne peptidique renfermant 323 acides aminés.

Outre son activité coagulante, spécifique sur la caséine κ , la chymosine a une activité de protéolyse générale sur toutes les fractions caséiniques. L'activité optimale de cette enzyme a lieu à pH 5,5 et à une température de 42°C. Elle est stable à pH acide 5,3 et 6,3 et dénaturée à pH 8. Son inactivation thermique, selon Goursand (1999), a lieu dès 50°C et elle est totale à 61°C.

La sécrétion de la pepsine ne devient prépondérante qu'une fois la synthèse de la chymosine est arrêtée (Ramet, 1990). Cette protéase est caractérisée par un poids moléculaire de 33 400 Da. Bien que l'action protéolytique de la pepsine soit voisine de

celle de la chymosine ainsi que les fortes homologues de structure que présentent ces deux enzymes, les conditions d'action sont différentes. En effet, selon Martin et *al.* (1982) et Goursand (1999), il y a une différence importante en pratique qui consiste en l'influence du pH sur l'activité ; la chymosine est encore active à pH 6,8, alors que la pepsine ne coagule plus le lait au dessus de pH 6,7.

2. Succédanés de présure

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

Un succédané de la présure animale doit présenter une bonne solubilité dans l'eau, un degré de pureté élevé et une activité protéolytique et lipolytique faibles. Par ailleurs, il doit respecter, les modalités habituelles du déroulement du processus de la fabrication fromagère (Smeets, 1995). Pour cela, tout succédané de présure doit répondre aux critères suivants :

- L'activité protéolytique de l'enzyme ne doit pas être trop élevée ;
- Les propriétés rhéologiques du coagulum doivent évoluer après floculation de manière à assurer le travail mécanique du gel dans les délais habituels ;
- La synérèse du coagulum au cours de l'égouttage et les modalités d'affinage devaient permettre d'obtenir les caractéristiques usuelles des fromages dans un délai sensiblement égal à celui de la présure ;
- Les rendements fromagers doivent être très proches ou supérieurs à ceux obtenus lors de l'emploi de la présure.

2.1. Succédanés de présure d'origine végétale

La coagulation de lait provient des pratiques que l'on retrouve dans le monde entier, par l'emploi, non pas d'acide lactique ou d'enzymes animales, mais d'extraits végétaux (Froc, 2001). Les coagulases végétales sont extraites par macération de divers organes de plantes supérieures, les plus connues sont : la ficine, extrait du latex du figuier

(*Ficus caricas*) ; la papaine, extraite des feuilles du papayer (*Carica papaya*), et la broméline, extraite des tiges d'ananas (*Ananas comasus*).

La fleur du cardon (*Cynara cardunculus*) a été et est encore utilisée dans des fabrications de fromages fermiers. En effet, les fleurs séchées de *Cynara cardunculus* ont été employées avec succès pendant des centaines d'années notamment dans la fabrication des fromages traditionnels portugais au lait de brebis (Sousa et Malcata, 2002 ; Zhao et al., 2003).

Bien que de nombreux coagulants d'origine végétale ont été expérimentés il faut, toutefois, noter qu'ils sont peu utilisés en technologie laitière. Selon, le pouvoir coagulant très variable de ces extraits ainsi que leurs activité protéolytique très élevée confèrent un goût d'amertume pour le fromage (Lopez et al., 1996 ; Cuvellier, 1999). Ainsi, une utilisation efficace de ces préparations enzymatiques oblige à les purifier au préalable, ce qui augmente leur prix de revient.

2.2. Succédanés de présure d'origine microbienne

L'industrie de fermentation s'est intéressée à la production de protéases susceptibles de remplacer la présure à partir de micro-organismes. Dans ce but, de multiples espèces de bactéries et de champignons inférieurs ont été étudiées afin de pallier la pénurie mondiale de présure.

La recherche d'enzymes pour substituer la présure a conduit à de multiples travaux sur plusieurs bactéries: *Streptococcus liquifaciens*, *Micrococcus caseolyticus*, *Bacillus cereus*, et *Bacillus coagulans*. Les protéases extraites de ces bactéries ont plusieurs inconvénients, tels que la non spécificité de l'hydrolyse, la protéolyse excessive qui a pour conséquence un faible rendement fromager et une modification des caractéristiques organoleptiques des fromages (goût acide, amertume). Aucune préparation n'est commercialisée (Ramet, 1985 ; Andren, 2002).

Les enzymes d'origine fongique, au contraire, ont donne des résultats meilleurs, souvent comparables a ceux obtenus avec la présure ; plusieurs préparations sont déjà commercialisées sur le marche international et utilisées a plus ou moins grande échelle selon les pays. Ces préparations proviennent de trois genres de moisissures : *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* (Ramet, 1985 ; Andren, 2002).

Grâce au développement du génie génétique il est actuellement possible de produire de la chymosine fermentaire qui résulte du clonage du gène responsable de la production de la chymosine à partir de l'estomac de veau sur certains micro-organismes ; les plus utilisés sont: *Escherichia coli*, *Kleyveromyces* et *Aspergillus*. Cette méthode constitue l'une des voies porteuses d'espoir pour la synthèse d'enzymes utilisables dans l'industrie laitière. La chymosine fermentaire, selon Goursand (1999), a une structure identique à celle synthétisée dans l'estomac du jeune bovidé et fournit les mêmes performances que la présure pure en terme d'activité enzymatique, utilisation et conservation.

2.3. Succédanés de présure d'origine animale

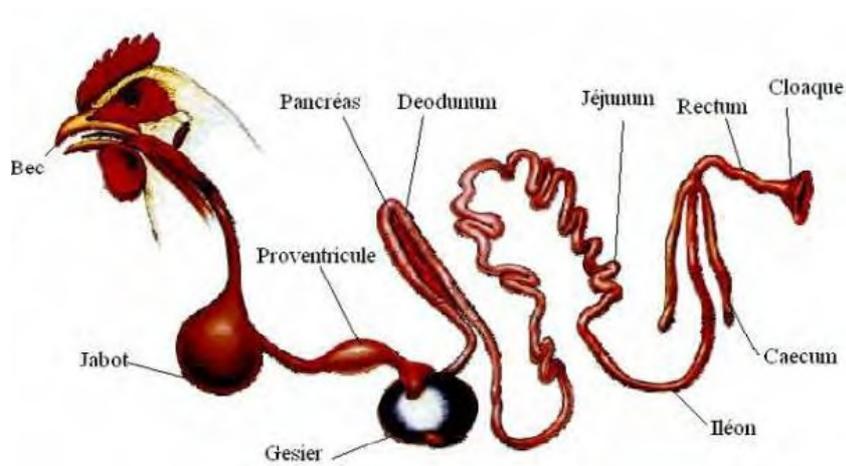
Les enzymes coagulants d'origine animale sont des protéases gastriques. Les plus employés sont la présure, les pepsines; bovine, porcine et de poulet. Ces protéases extraites du jus gastrique sont secrétées sous forme inactive (zymogène), et sont activées par les conditions acides du jus gastrique.

L'appareil digestif de certains mammifères secrète diverses protéases autres que la présure notamment la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine. Les deux premières enzymes bien que capables de coaguler le lait, ont donné de mauvais résultats en fromagerie à cause de leur activité protéolytique excessive.

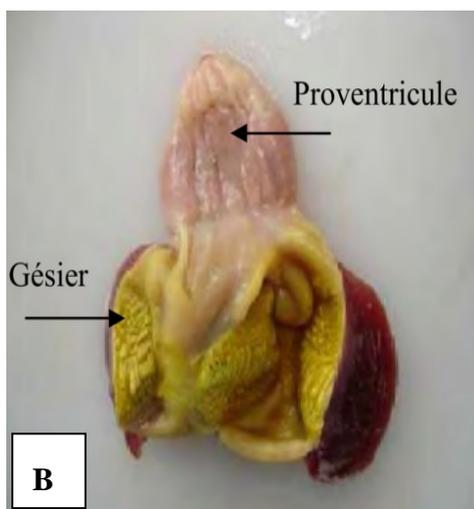
La pepsine bovine, selon Anifantakis et Kandarakis (1983), peut substituer, avec succès, la présure habituelle dans la fabrication du fromage Feta. L'activité coagulante de la pepsine bovine n'est pas aussi dépendante du pH que celle de pepsine porcine, et peut coaguler le lait à des pH supérieurs à 6,9, son activité protéolytique est proche de celle de la présure. Elle est utilisée en fromagerie en mélange avec la présure.

L'extraction et l'utilisation de la pepsine porcine ont débuté durant la première guerre mondiale pour pallier une pénurie de la présure, mais n'a été réellement industrialisé qu'à partir des années 60. Elle est extraite de l'estomac de porcs sous forme inactive, puis activée par acidification à pH 2, son poids moléculaire est de 34 KDa (Ernstrom, 1983). Cependant, l'emploi de la pepsine porcine présente pour la coagulation du lait des difficultés, à cause d'une activité protéolytique supérieure à celle de la présure, avec présence d'arrière gout et d'armature pour certains fromages (Brule et Lenoir, 1997). En revanche, selon Ramet (1990), la pepsine porcine, en mélange avec la présure, permet d'obtenir de meilleurs résultats dans la fabrication de fromages acides.

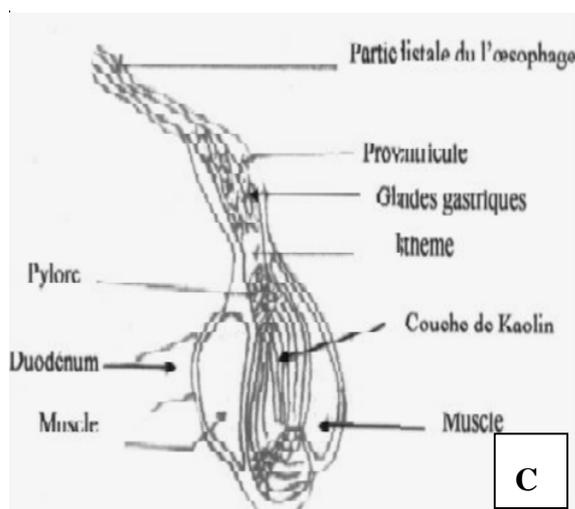
La pepsine de poulet est une enzyme extraite à partir de proventricules du poulet (*Gallus gallus*) considérés comme sous-produit d'abattage. C'est un renflement fusiforme de longueur moyenne de 3 cm, situé au dessus de gésier recouvert d'une couche épithélium formée de cellules cylindriques (figure 3). Des glandes de type tubulaire ont des orifices formant des rangées des mamelons visibles à l'œil nu. Ces cellules sont responsable de la sécrétion d'une proenzyme protéolytique (pepsinogène) et l'acide chlorhydrique (Alamargot, 1982).



A



B



C

Figure 03: Photographie et schéma Appareil digestif du poulet (A); Complexe stomacal du poulet (B)

(C) Anatomie du complexe stomacal des Gallinacées (Larbier et Leclercq, 1992)

Bohak (1969) rapporte que le pepsinogène de poulet a un poids moléculaire de 43 Kda avec 387 résidus d'acides aminés. Le pH optimum de la pepsine du poulet est de 2.8. L'enzyme reste stable à pH 8, et devient inactive à pH 8,5. Cette stabilité est très liée à la température. En effet, Bohak (1969), rapporte qu'une solution de pepsine à pH 8,2 maintient 93% de son activité après 20 min à la température de 24°C et seulement 10 % à 37° C. Cet auteur ajoute qu'à pH 7,8 l'enzyme perd seulement 10% de son activité après 24 heures à température ordinaire et 10%/ heure à 37°C. De même, une solution de pepsine de poulet dans 0.02N ou 0.01N d'HCl est stable dans ces conditions, et perd moins de 5% après 24 heures à 37°C ou une semaine à 4°C (Donta et Van Vukis, 1970 ; Crevieu-Gabriel et *al.*, 1999).

Plusieurs études ont été réalisées afin d'introduire la pepsine de poulet comme succédané de la présure. Selon Green (1975), la fabrication de fromage de type cheddar à l'aide de la pepsine du poulet a été réalisée, mais le produit obtenu était de qualité inférieure, il présentait un corps mou, peu d'arômes et un arrière goût assez prononcé due à une protéolyse excessive. En revanche, le cheddar préparé par un mélange de pepsine de poulet et de pepsine porcine était similaire à celui préparé par de la présure (Green et *al.*, 1984). Récemment, l'étude menée par Morsli en 1996 a montré que l'extrait du pro ventricule du poulet a permis la fabrication d'un fromage à pâte molle (Camembert) dont la qualité organoleptique ainsi que le rendement étaient comparables au fromage témoin préparé avec la présure. Récemment, la pepsine du pro ventricule du poulet a été utilisée avec succès dans la fabrication de fromages locaux en Israël (Cuvellier, 1999).



**MATERIEL
&
METHODES**

I. Matériel

1. Lait

Le lait employé est le lait écrémé en poudre, de qualité moyenne température (Low heat) à 0 % de matière grasse. Cette poudre est importée par l'ONIL-Algérie (Office National Interprofessionnel du Lait). Elle est fournie par l'industrie laitière Candia de Bejaïa. La poudre de lait est conservé à + 4°C, à l'abri de la lumière et de l'humidité.

2. Présure

La présure utilisée est une présure commerciale sous forme d'une poudre d'origine animale. Elle est fournie par la laiterie de Boudouaou (wilaya de Boumerdes). Elle est caractérisée par une force coagulante de 1/100.000 à 520 mg de chymosine /1 g de présure. La poudre de présure est conservée à + 4°C. A partir de celle-ci, une solution mère est préparée par reconstitution d'1 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée.

3. Proventricules du poulet

1 Kg de proventricules de poulet est obtenu au niveau de marché couvert de Bejaïa.

II. Méthodes

1. Préparation des proventricules

Les proventricules de poulet sont acheminés vers le laboratoire de génie biologique à l'Université A.MIRA de Béjaïa où ils sont immédiatement dégraissés puis ouverts par incision longitudinale et vidés de particules alimentaires adhérentes aux parois. Enfin, ils sont rincés à l'eau courante, égouttés puis répartis en lot de 100 g dans des sacs en plastique et congelés à – 20°C jusqu'à utilisation. La figure 4 illustre la forme externe et interne de proventricules.

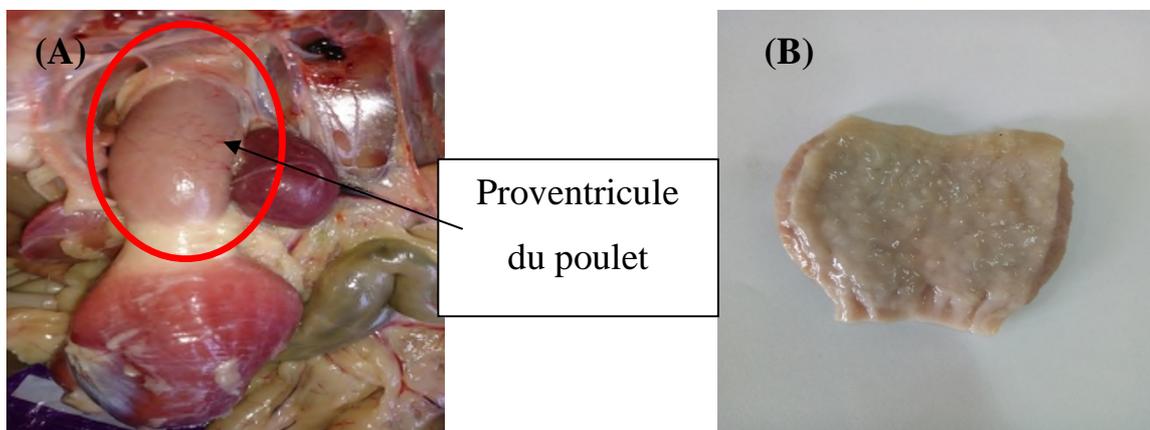


Figure 4 : Photographie de la forme externe (A) et interne (B) du proventricule du poulet

2. Obtention (extraction) de l'extrait pepsique

L'extraction de la pepsine est réalisée en suivant le protocole proposé par Bohak (1970). Les principales étapes sont présentées en figure 05. Le diagramme d'extraction de la pepsine est rapporté par la figure 06.

Les proventricules, décongelés à + 4°C, sont hachés à l'aide d'un mixeur ménager. Les proventricules broyés sont macérés, à température ambiante (25°C) pendant 3 heures, dans une solution saline composée de 30 % de NaCl et de 0,7 % de NaHCO₃ et à raison de 300 ml de la solution de macération pour 100 g de proventricules (Figure 5 (A)). Le macérât est filtré à travers de la gaze (Figure 5 (B)).

La solution obtenue est acidifiée à l'aide d'une solution d' HCl 3N jusqu'à pH 2 afin d'activer le pepsinogène (Figure 5 (C)). Après centrifugation du filtrat à 5000 g pendant 30 min et à + 4°C (Figure 5 (D) et (E)), le surnageant obtenu est ajusté à pH 6,4 avec une solution de NaOH 3N et constitue l'extrait enzymatique brut (Figure 5 (F)). Enfin, l'extrait obtenu est conservé à - 20°C jusqu'à utilisation.

Le culot, qui représente le mucilage et les débris des tissus, est éliminé.

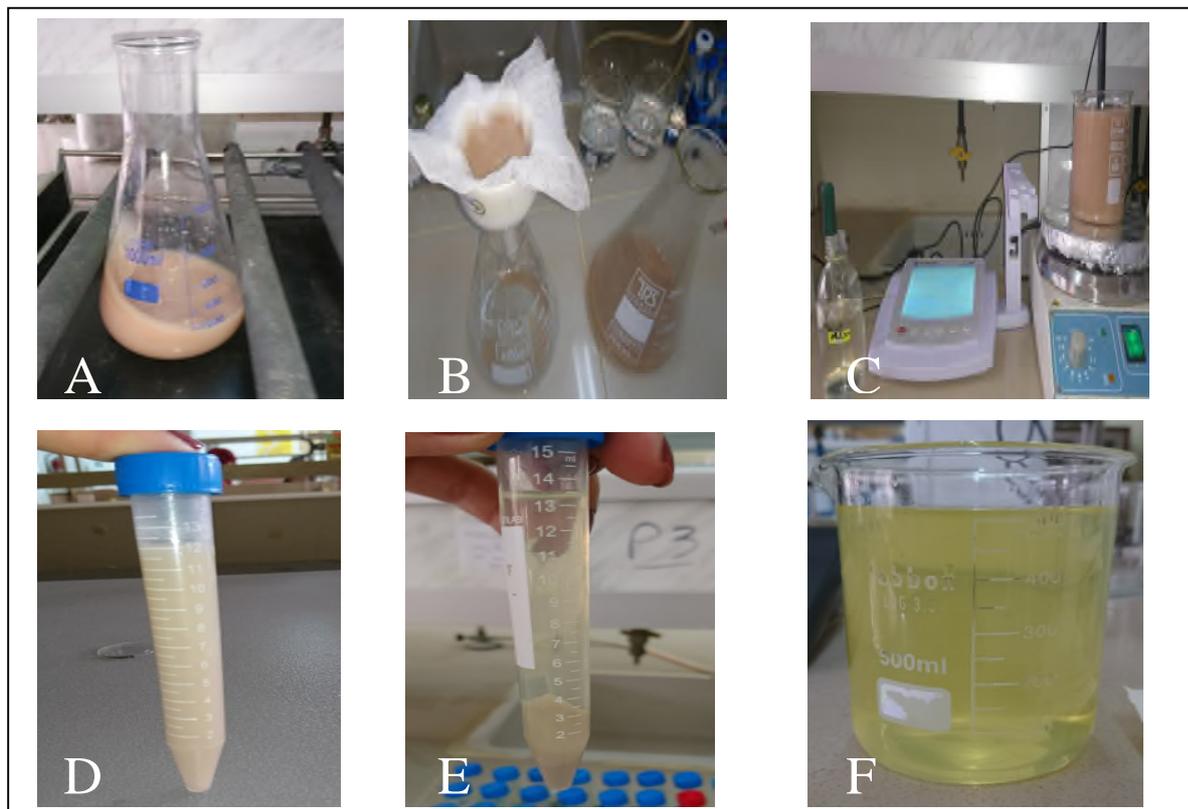


Figure 5 : Photographies des principales étapes d'extraction de la pepsine du poulet
A : macération, B : filtration, C : activation du pepsinogène, D : macérât avant centrifugation,
E : macérât après centrifugation, F : extrait enzymatique brut (extrait coagulant le lait).

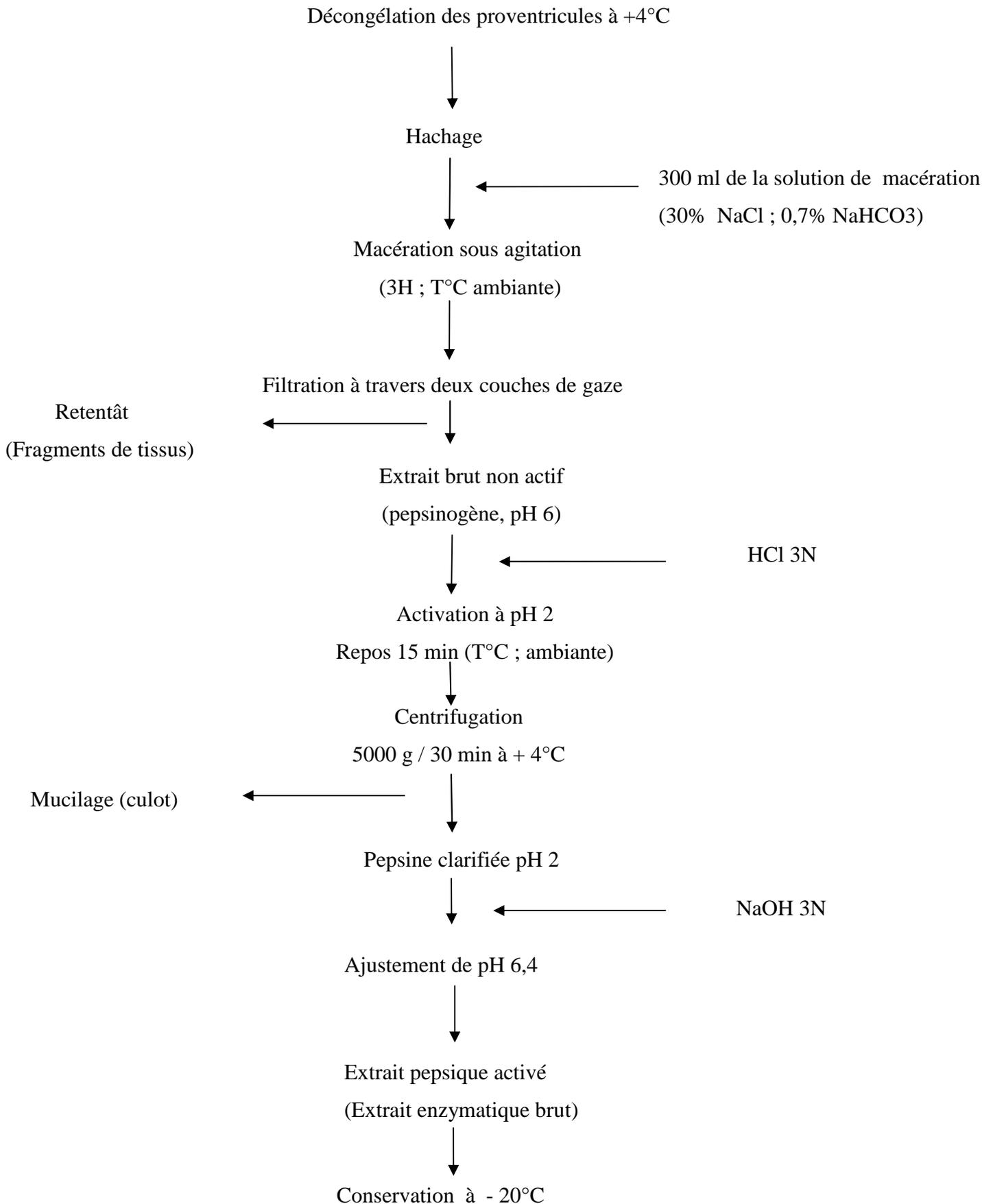


Figure 6 : Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet (Bohak, 1970)

3. Etude de l'extrait enzymatique coagulant le lait

3.1. Mesure de l'activité coagulante

L'activité coagulante est déterminée selon la méthode de Berridge (1945)^{*} modifiée par Collin et *al.* (1977). Cette méthode permet d'exprimer l'activité de l'extrait enzymatique en unité de présure (UP), qui correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour coaguler 10 ml de substrat standard en 100 secondes à 30°C.

L'unité de présure est calculée selon l'expression suivante :

$$UP = 10 \cdot V / T \cdot v$$

Avec :

V: volume de lait (substrat de Berridge)* (ml)

v : volume de l'extrait enzymatique (ml)

T_c : temps de coagulation (sec)

* Le substrat de l'enzyme est reconstitué selon la méthode de Berridge par dissolution de 12 g de poudre dans 100 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,01M. Le pH de substrat ainsi préparé est ajusté à 6,4 (Annexe 1).

3.2. Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est mesurée selon la méthode de Green et Stackpoole (1975) (annexe 2). Cette mesure permet d'évaluer le taux de dégradation du substrat (caséine) par l'enzyme lors de la phase primaire. Cette activité est déterminée par mesure de la concentration en produits d'hydrolyse de la caséine, solubles dans l'acide trichloracétique (TCA à 12 %). Le dosage des peptides solubles est effectué selon la méthode de Lowry et *al.* (1951). Le taux d'hydrolyse de la caséine est déterminée à l'aide d'une courbe étalon établie en utilisant la tyrosine (100 µg/ml) comme protéine standard (annexe 2, Figure 2).

Pour l'étude de l'activité protéolytique, la concentration de l'extrait coagulant est ajustée de façon à obtenir un temps de coagulation voisin de 5 min à 35°C selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante (Green et *al.*, 1984).

3. 3. Dosage des protéines

La teneur en protéines de l'extrait enzymatique brut est déterminée selon la méthode classique de Lowry et *al.*, (1951). Cette méthode est basée sur un procédé en deux étapes ; la première est la réduction de cuivre (Cu^{2+}) en (Cu^+) par les protéines dans une solution alcaline, la deuxième est la réaction au réactif de Folin-Ciocalteu, à base de phosphomolybdates et de phosphotungstates, qui réagit avec l'acide aminée tyrosine et tryptophane et à moindre degré avec la cystéine et l'histidine pour donner une coloration bleu .

L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la concentration en protéines contenue dans un extrait. Cette concentration est déterminée à l'aide d'une courbe étalon établie en utilisant le sérum d'albumine bovine (BSA 200 $\mu\text{g/ml}$) comme protéine standard (annexe 3, Figure 3).

4. Caractérisation partielle de l'extrait enzymatique brut

La caractérisation de l'extrait enzymatique brut, par comparaison à la présure animale consiste en la détermination des conditions optimales de l'activité coagulante en fonction de certains facteurs.

La mesure de l'activité coagulante est déterminée en mesurant le temps de coagulation selon la méthode de Berridge (1945) modifiée par Collin et *al.* (1977).

4.1. Détermination de la température optimale d'activité

La température optimale de la coagulation du lait a été déterminée en faisant varier la température du mélange réactionnel de 30°C à 70°C avec un pas de 5°C.

4.2. Influence de pH du lait

L'influence de pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait pepsique et de la présure étudié a été déterminée en faisant varier le pH du lait de 5,5 à 7,5 avec un intervalle de 5.

4.3. Détermination de la concentration optimale de CaCl_2

La concentration optimale en CaCl_2 de la coagulation du lait a été déterminée en faisant varier la concentration du lait en ions CaCl_2 de 0,01 M à 0,1 M.

4.4. Influence de la concentration en extrait enzymatique

L'effet de la concentration des extraits enzymatiques étudiés a été déterminé en faisant varier leurs concentrations en protéines de 9,27mg / ml à 27,82 mg / ml.

5. Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique

5.1. Stabilité thermique

La stabilité thermique de l'extrait coagulant le lait a été étudié en mesurant son activité coagulante résiduelle après leurs incubation à des températures variables de 30°C à 70°C pendant 30 min avec un intervalle de 5°C.

5.2. Stabilité au cours de la conservation

L'extrait enzymatique est conservé à + 4°C et à - 20°C pendant 2 mois. L'activité résiduelle est mesurée périodiquement.

A decorative graphic of a scroll with a marbled paper texture. The scroll is oriented horizontally and has rounded corners. It features three circular tabs: one on the left side, one on the top right corner, and one on the bottom left corner. The text is centered on the scroll.

**RESULTATS
&
DISCUSSION**

1. Rendement d'extraction et caractéristiques de l'extrait coagulant brut

1.1. Rendement de l'extraction de la pepsine

Après prétraitement, la quantité totale de matière première fraîche récupérée est de l'ordre d'environ 8 g à partir d'un pro ventricule de poulet.

Le volume moyen de l'extrait enzymatique obtenu à partir de 100 g de proventricules de poulet est d'environ 251 ml, ce qui lui confère un rendement d'extraction moyen de 83,33%. Ce rendement est similaire à celui indiqué par Siar (2014) (soit de 84,43 %).

Le rapport des proventricules à la solution d'extraction est de 1:3. L'activité coagulante totale rapportée au volume d'extraction et à l'unité de masse de proventricules frais est de 1393,05 unités présure totales et 13,93 unités présure totales par gramme de proventricules frais respectivement.

1.2. Caractéristiques de l'extrait coagulant brut

L'extrait pepsique coagulant est sous forme d'un liquide de couleur jaunâtre et d'odeur peu prononcée. Le temps de coagulation est très court et est de 08 secondes. L'extrait brut se caractérise par une activité coagulante de 5,55 UP / ml une teneur en protéines de 18,55 mg /ml.

En ce qui concerne la couleur et l'odeur, nos résultats sont similaires à ceux rapportés par d'autres études (Adoui, 2007 ; Nouani et *al.*, 2011 ; Siar, 2014). L'activité coagulante trouvée dans la présente étude est proche à celle noté par Paez De Leon en 1995. Par contre, des valeurs différentes ont été signalées par certains auteurs. En effet, des activités de 15,08 UP/ml, 13,33 UP/ml et de 18,61 UP/ml ont été rapportées par Adoui (2007), Hamrani (2008) et Siar (2014) respectivement. Par ailleurs, l'étude menée par Benyahia en 2013 a indiqué une activité élevée de l'ordre de 60 UP/ml.

La teneur en protéines totales dans l'extrait obtenu est proche par celle indiquée par Siar (2014) qui a rapporté un taux de 20,10 mg /ml. Cependant, la concentration de l'extrait en protéine reste inférieure à celle obtenue par Nouani et *al.*(2011) qui a noté une teneur de 147,3 mg/ml.

2. Activité protéolytique des extraits coagulants

Toutes les enzymes coagulantes qu'elles soient d'origine animale, végétale ou microbienne sont capables d'hydrolyser la caséine κ , provoquant ainsi la coagulation du lait, cette condition est suffisante pour l'utilisation de ces enzymes en industrie fromagère (Alais, 1984), mais pour la production des fromages de qualité, il faut tenir compte de leur grande activité protéolytique non spécifique supplémentaire qui leur donne le pouvoir d'hydrolyser les caséines α et β (Vignola, 2002). De ce fait, pour assurer un bon rendement fromager et pour éviter certains défauts de goût et de texture qui peuvent apparaître au niveau des fromages, tout succédané de présure doit présenter une faible protéolyse .

L'évolution de l'azote non protéique au cours de l'hydrolyse enzymatique est illustrée en figure 7.

Les résultats obtenus montrent que la pepsine de poulet présente une activité protéolytique plus importante que la présure pure. L'activité protéolytique obtenue est de l'ordre de 52,75 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait pepsine de poulet et 31,125 $\mu\text{g/ml}$.

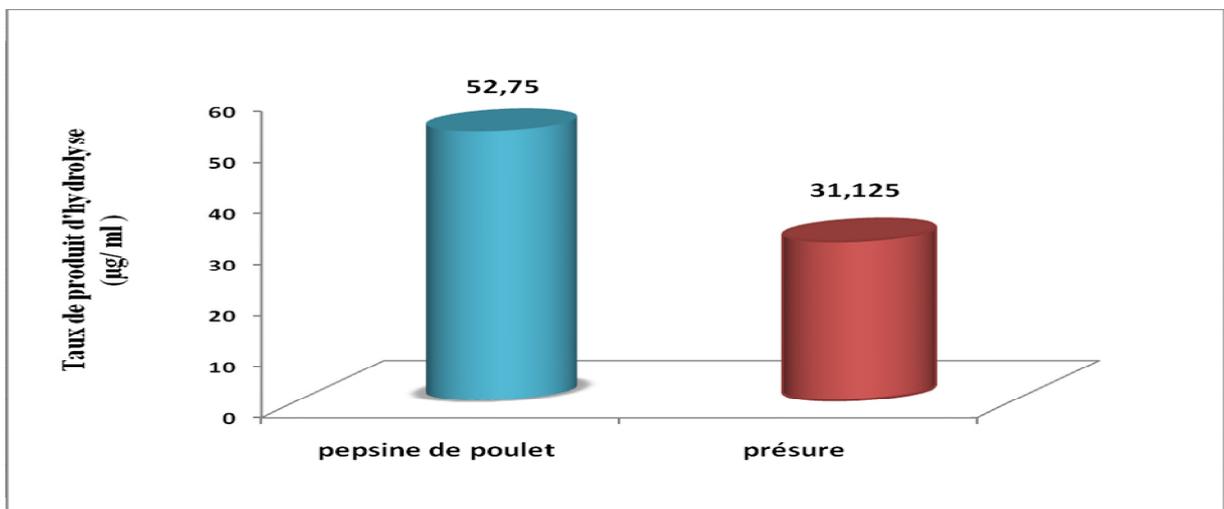


Figure 7 : Quantités des produits d'hydrolyse libérés par les extraits enzymatiques étudiés.

Les résultats observés dans la présente étude sont similaires à ceux rapportés par de nombreux auteurs. En effet, les travaux de Nouani et *al.* en 2011 ont indiqué une activité 32 $\mu\text{g/ml}$, un taux trois fois supérieur à la présure. Par ailleurs, Siar (2014) a rapporté une teneur de 117 $\mu\text{g/ml}$ soit une activité protéolytique trois fois plus élevée que la présure.

La faible activité de la présure pourrait être expliquée par son activité protéolytique limitée et spécifique. En effet, pendant la première phase de dégradation, correspondant à la

phase enzymatique, la caséine κ est clivée spécifiquement au niveau de la liaison 105-106 (Phe-Met), alors que l' α et la β caséines ne sont pas affectées (Alais, 1984). Cette sélectivité et spécificité de la présure pour son substrat, la caséine κ fait d'elle l'enzyme par excellence utilisée en fromagerie (Danley et *al.*, 1988).

3. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

3.1. Influence de la température sur l'activité coagulante

La détermination de la température optimale d'activité de la pepsine du poulet et de la présure a été réalisée en mesurant le temps de coagulation à différentes températures du lait allant de 30°C à 70°C.

Les résultats, illustrés dans la figure 8, montrent que les deux enzymes se comportent différemment. L'optimum d'action de l'extrait pepsique et de la présure animale est de 60°C et 55°C respectivement. Au delà de ces températures, on note une baisse d'activité pour les deux extraits coagulants.

Par ailleurs, la pepsine de poulet, comparée à la présure animale, se montre encore active à 65°C. A cette température, la présure est complètement détruite.

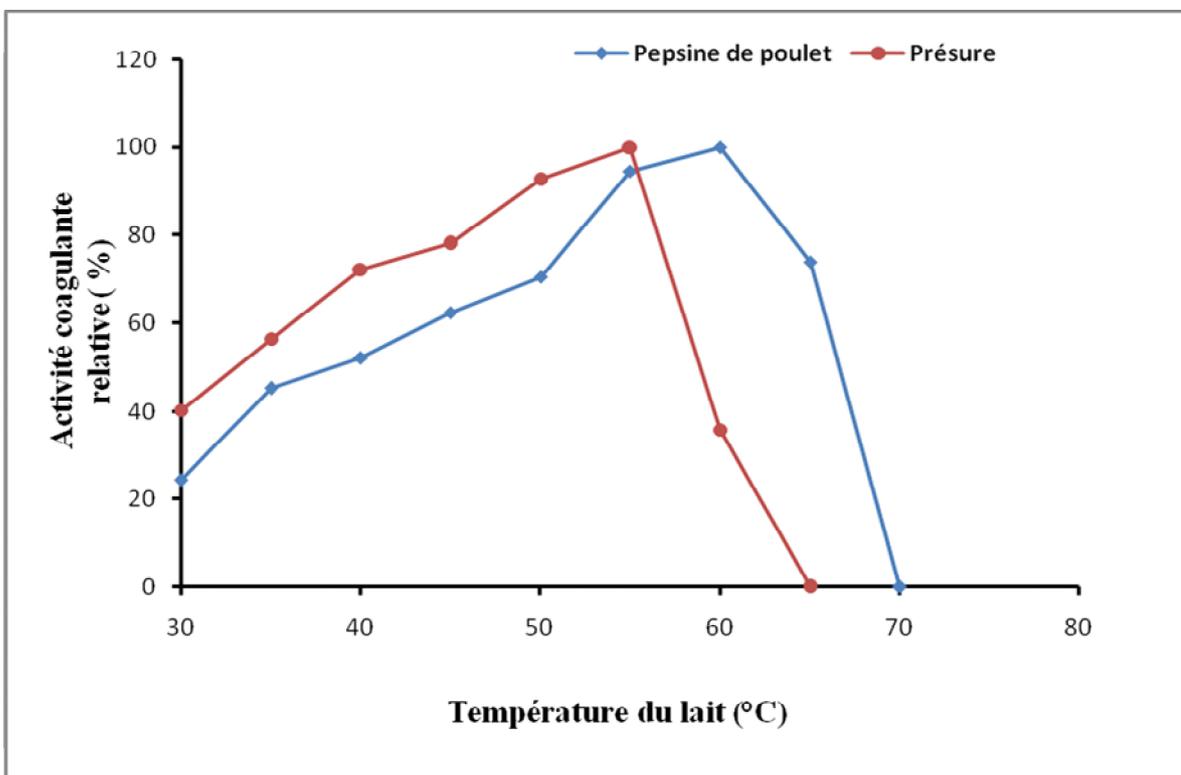


Figure 8 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante.

Selon Mietton et *al.*(1994), L'influence de la température sur le temps de prise résulte de trois effets :

- la thermo sensibilité de l'enzyme coagulante (la présure commence à se dénaturer à 35°C et est totalement dénaturée à 65°C),
- la vitesse de la réaction enzymatique.
- la vitesse d'agrégation.

Morsli et *al.*(1996) et Hamrani (2008) ont rapporté que la température optimale de l'activité de la pepsine du poulet est de 40°C. Par contre, l'étude d'Adoui en 2007 et de Siar en 2014 ont indiqué un optimum thermique de 50°C et 55°C respectivement. Ces mêmes auteurs ont rapporté une activité optimale de la présure animale à 50°C.

Selon Garnot et Martin (1980), la présure présente une activité coagulante à une température voisine de 40 °C. La température optimale pour la coagulation du lait par la présure est d'environ 45°C (Lucey, 2002).

Dans une étude similaire, Bengana (2001) a rapporté une activité optimale à 45°C pour la chymosine et la pepsine. Les travaux de Maachou (2004) et de Slamani (2004) ont indiqué une température optimale d'activité de 55°C pour la pepsine purifiée de limon et de 52°C pour la pepsine ovine respectivement.

Par ailleurs les enzymes d'origine microbienne et végétale présentent généralement une température optimale d'action plus importante par rapporte aux enzymes d'origine animale. En effet, Morsli (1997) a noté que l'optimum d'action pour la cynarase de l'artichaut est à 60°C et celui de la ficine du latex de figuier est à 80°C. L'optimum d'activité coagulante pour l'extrait brut de fleurs de cardon est obtenu, selon Mouzali (2001), à une température du lait égale à 65°C. Fernani (2003) a indiqué que la température optimale de coagulation de la protéase purifiée des graines de melon est de 70°C.

De plus, une température d'activité de 52°C à 62°C a été apportée par Grousaud (1999) pour les trois suspensions coagulantes fongique *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* et *Endothia parasitica*. Nouani et *al.* (2009) ont trouvé une activité maximale à 50°C pour la coagulase purifiée de *Mucor pusillus*.

3.2. Influence du pH du lait sur l'activité coagulante

L'effet de pH du lait sur l'activité coagulante de la pepsine de poulet et de la présure a été étudié en ajustant le pH du lait aux valeurs de l'intervalle allant de 5,5 à 7. Les résultats

indiqués par la figure 9 montrent que des deux préparations enzymatiques étudiées présentent des comportements analogues vis-à-vis le pH du lait.

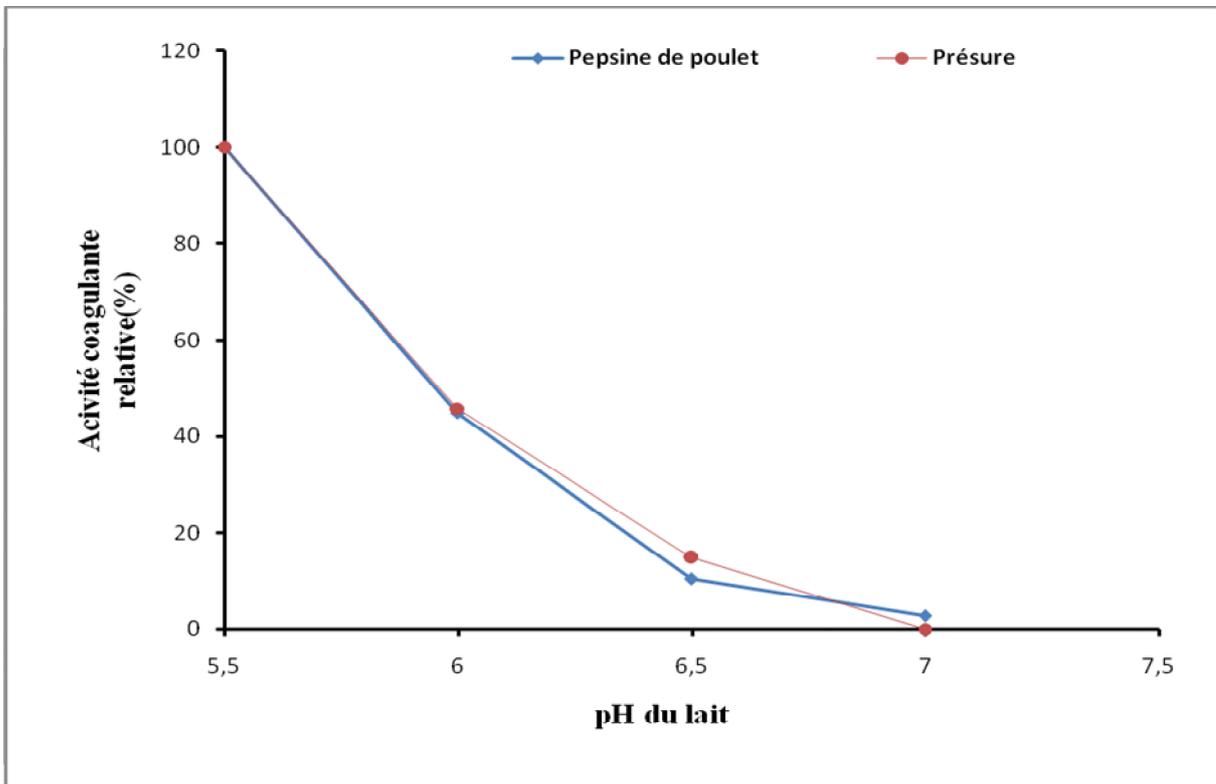


Figure 9 : Effet de pH du lait sur l'activité coagulante

L'activité coagulante de ces deux préparations enzymatiques diminue au fur et à mesure que le pH du lait augmente. Une activité relativement importante est constatée à pH 5,5. Au delà de cette valeur, l'activité coagulante chute.

A pH 6,5 l'activité de la pepsine de poulet et de la présure animale ne présentent que 10,4 % et 14,83 %, respectivement.

A pH 7 la pepsine de poulet n'est pas encore inhibée complètement; elle montre une faible activité coagulante est de 2,66 %, tandis que la présure est complètement inactivée.

Selon Ramet (1990), la diminution du pH de 7,0 à 5,2 engendre la diminution du temps de coagulation. De ce fait, l'acidification du lait favorise la réaction d'agrégation par suite à la diminution de la stabilité des micelles, liée à la neutralisation des charges négatives et à la libération d'ions calcium.

Green et *al.*(1984) ont indiqué que lorsque le pH du lait est abaissé de 6,65 à 6,5 l'activité coagulante de l'extrait pepsique entraîne une double augmentation. La pepsine de poulet est caractérisée par une activité maximale à pH5 (Nouani et *al.*, 2009 ; Benyahia, 2013). En revanche, le pH optimum de la pepsine et la chymosine est de 2,8 et 3,4 respectivement, lorsque l'hémoglobine est employée comme substrat (Bohak, 1969 ; Alais, 1974).

L'optimum d'hydrolyse de la caséine par la chymosine est compris, selon Mietton et *al.* (1994), entre pH 5,4 et pH 5,7 tandis qu'il se situe entre 2 et 3 pour la pepsine. Par ailleurs, la pepsine de poisson (*Munida*) a une activité optimale entre pH 6,5 et 7,5 (D'Ambrosio et *al.*, 2003). Garnot et Martin (1980) ont rapporté un pH optimum de 5,8 pour la présure animale.

D'Ambrosio et *al.* (2003) ont indiqué une activité optimale dans l'intervalle de pH compris entre 6,5-7,5 pour la pepsine purifiée de poisson. Dans une étude similaire, Slamani (2004) a noté pour la pepsine ovine que le temps de coagulation est plus court lorsque le pH est abaissé au dessous du pH du lait (pH 6,6) et à pH supérieur à 6,7, l'enzyme commence à être inactivée.

Morsli (1997) a montré que la cynarase de l'artichaut et la ficine du latex de figuier présentent une bonne activité coagulante jusqu'à pH 6,6. Par contre, Mouzali (2001) indique un pH optimum d'action égale à 5,2 pour l'extrait brut de cardon. La protéase purifiée des graines de melon est caractérisée par un pH optimal d'activité de l'ordre de 5.5 (Fernani, 2003) .L'activité optimale de la coagulase extraite à partir de l'artichaut se situe entre pH 4,5 et 5,5 (Llorente et *al.*, 2004), alors que celle de la broméline est de 8,5 (Bruno et *al.*,2002).

Matoub (2000) a noté une activité coagulante optimale au pH 6,2 pour la coagulase de *Bacillus subtilis*(Lc33). Les enzymes fongiques, selon Fernandez-Lahore et *al.* (1999), se caractérisent par un pH optimum d'action entre 2,5 et 5,5. L'optimum d'activité pour la protéase fongique *Mucor pusillus* a été obtenu, selon Nouani et *al.*(2005), au pH égale à 5,0.

En conclusion, l'effet du pH du lait sur l'activité coagulante des enzymes est fortement dépendant de leur origine et de la nature du substrat.

3.3. Influence de la concentration de CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante

L'effet du calcium sur l'activité coagulante de la protéase issu des proventricules de poulet, comparée à la présure, a été étudié en faisant varier sa concentration dans le lait de 0.01M à 0.1 M. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 10.

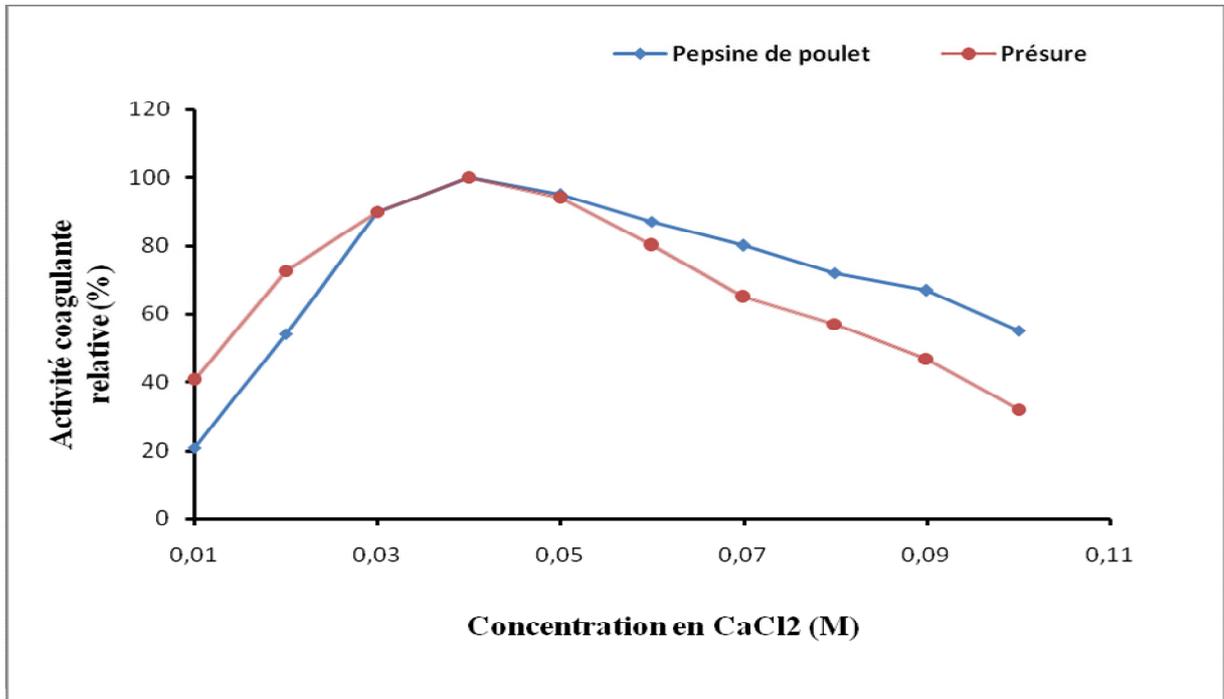


Figure 10 : Effet de la concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante.

Les résultats de la présente étude, montrent que l'activité coagulant augmente avec l'augmentation de la concentration en CaCl_2 jusqu'à atteindre 0.04 M et ce pour les deux extraits étudiés. Au delà de cet optimum, l'action des deux enzymes baisse. Le déclin est plus important dans le cas de la présure.

Selon Brule et Lenoir (1990), l'addition du calcium soluble entraîne une augmentation de la teneur en phosphate de calcium colloïdal lequel semble être le facteur déterminant de l'aptitude du lait à la coagulation par la présure.

L'addition de chlorure de calcium au lait, pratique courante en fromagerie, a pour effet de réduire le temps de coagulation et d'accroître la fermeté du coagulum, cette influence n'est pas seulement liée à l'augmentation des teneurs en calcium ionique mais intervient sur l'abaissement du pH, réduisant ainsi la stabilité micellaire (Eck, 1990).

Garnot et Martin (1980) ont rapporté que l'optimum d'activité de la présure d'origine animale est obtenu à la concentration en CaCl_2 de l'ordre de 0.02 M. Nos résultats concordent avec ceux obtenus récemment par Benyahia (2013). Les recherches de Siar (2004) et de Nouani et *al.*(2009), ont rapporté une concentration optimale en CaCl_2 de l'ordre de 0,02 M. Par ailleurs, d'autres études ont montré des concentrations un peu élevées. En effet, Machou (2004) et Slamani (2004) ont noté que l'activité optimale de la pepsine de poisson et d'ovin est obtenue avec une concentration en CaCl_2 du lait de 0.05M et 0.06 M respectivement. De plus, l'activité optimale de la coagulase purifiée des graines de melon est indiquée pour une concentration optimale en CaCl_2 de 0.08 M (Fernani, 2003).

3.4. Influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante

L'activité de l'extrait pepsique et de la présure, en fonction de la concentration en extrait coagulant, a été estimée en mesurant le temps de coagulation pour des concentrations en protéines dans les extraits variables de 9,27 mg/ml à 27,82 mg/ml.

D'après la figure 11, l'activité coagulante augmente quand la concentration en extrait augmente pour les deux extraits. De plus, contrairement à la pepsine, les résultats montrent la présence d'un palier correspondant à une concentration saturante en enzyme (à partir de 24,11mg/ml) pour la présure animale.

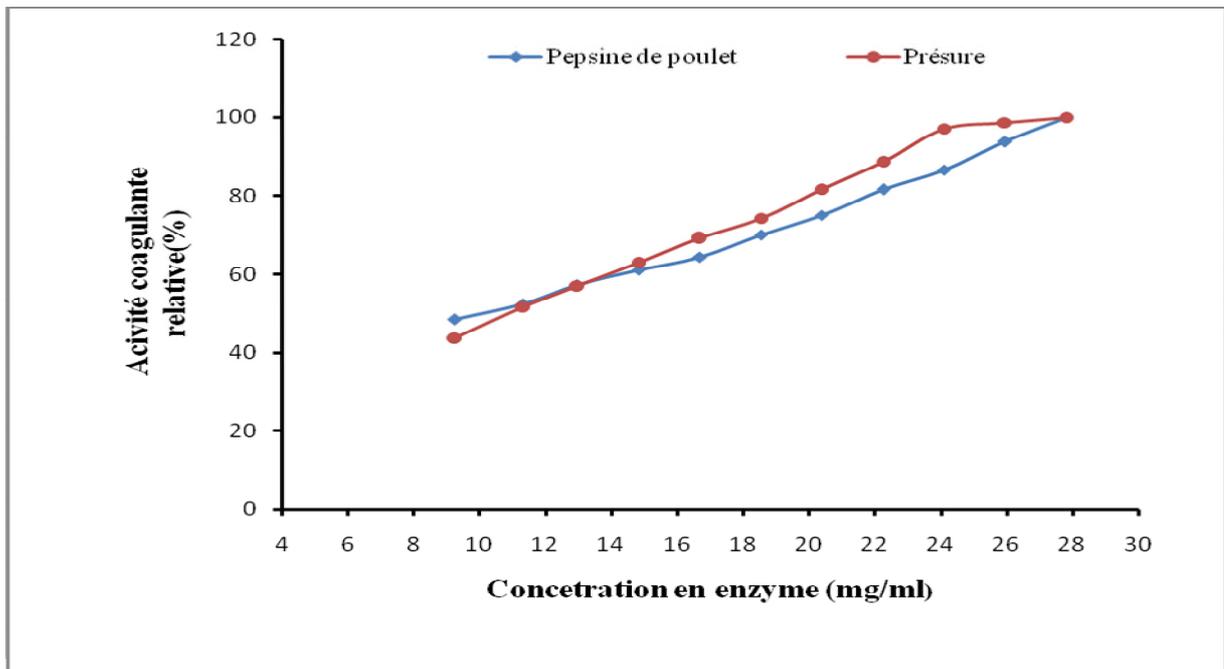


Figure 11 : Effet de la concentration des extraits sur les activités coagulantes.

L'activité coagulante de la présure croît linéairement en fonction de sa concentration lorsque celle-ci est faible, ce qui correspond aux doses employées en fromagerie (Garnot et Martin 1980 ; Goursand 1999).

Belhamiche (2005) a constaté un pallier de saturation en enzyme et ce pour la coagulase purifiée de *Mucor pusillus* dans l'intervalle de concentrations allant de 0,25 à 0,3 mg/ml.

Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en enzyme. La concentration en enzyme dans les limites utilisées en fromagerie influe aussi sur la vitesse de raffermissement du gel. Elle n'a en revanche pas d'effet sur la fermeté (Ramet et Weber, 1980).

4. Etude de la stabilité

4.1. Stabilité thermique

La stabilité thermique de l'extrait pepsique, comparé à la présure animale, a été réalisée en le maintenant, pendant 30 min, à des températures allant de 30°C à 70°C.

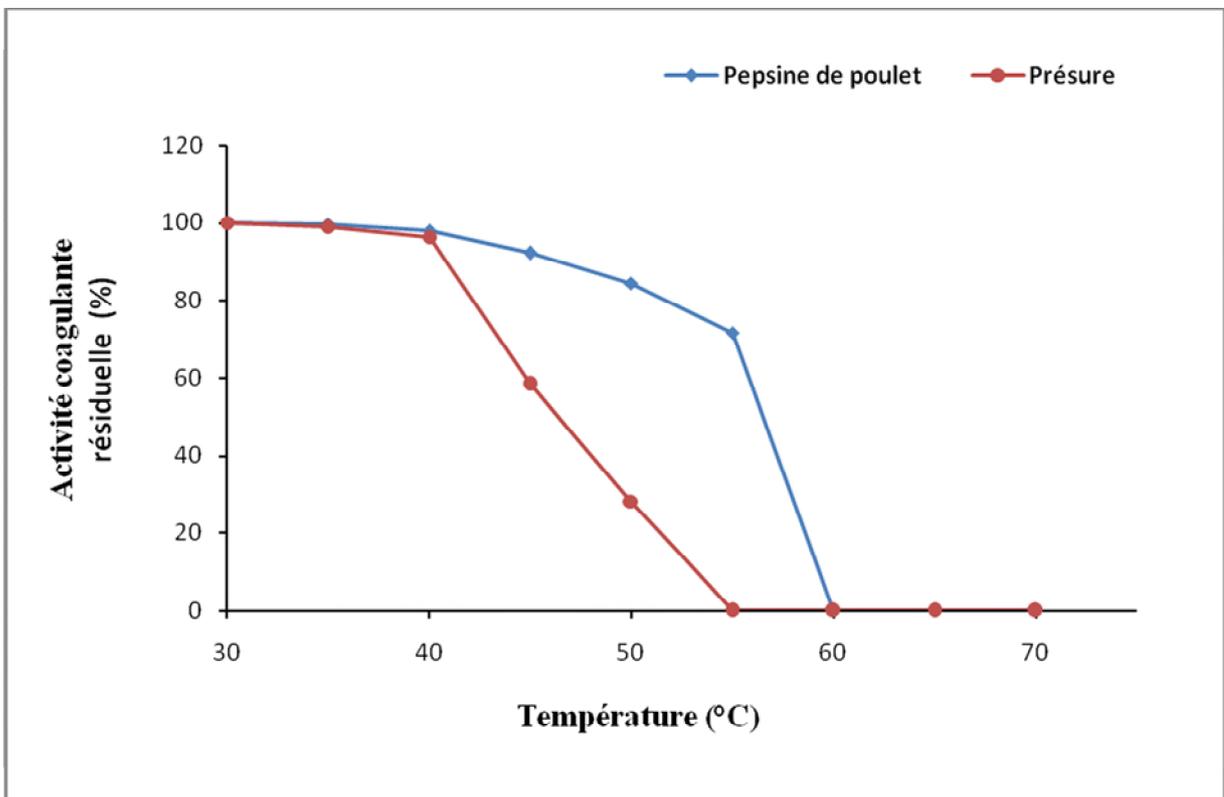


Figure 12 : Stabilité thermique de l'extrait brut et de la présure

Les résultats obtenus, illustrés dans la figure 12, montrent que l'activité coagulante des deux préparations coagulante (pepsine, présure) est relativement stable dans l'intervalle de températures allant de 30°C à 35°C pour la présure, et de 30°C à 40°C pour la pepsine de poulet. Au delà de ces valeurs, les deux extraits manifestent une baisse progressive de leurs activités coagulantes. A 55°C, la présure animale se trouve complètement dénaturée alors que la pepsine garde une activité de l'ordre de 72 % ; sa dénaturation a lieu à 60°C. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Nouani et *al.* (2011).

Les études menées sur les coagulases d'origine végétale et microbienne indiquent une meilleure stabilité aux températures élevées que celle de la présure animale. En effet, Morsli (1996), a noté une stabilité thermique élevée pour des coagulases végétales (artichaut, figuier), par comparaison à celle d'origine animale. De plus, les résultats obtenus par Belhamiche en 2005 ont montré qu'aux températures supérieures à 50°C, la protéase fongique purifiée du *Mucor pusillus* entraîne une baisse d'activité d'abord progressive à 55°C puis rapide à 60°C ; température pour laquelle la présure animale est complètement détruite.

Selon Alais (1984), lorsque la température s'élève au dessus de 50°C, la présure devient facile à dénaturer.

4.2. Stabilité à la conservation à 4°C et à - 20 °C

L'étude de la stabilité au cours de la conservation a été réalisée par l'entreposage des extraits bruts de poulet à + 4°C et à - 20°C. L'activité coagulante résiduelle, exprimée en pourcentage par rapport à l'activité coagulante initiale, a été réalisée périodiquement.

Les résultats obtenus, rapportés par la figure 13, indiquent que la pepsine de poulet congelée à - 20°C reste stable et garde 100% de son activité durant les huit semaines de conservation. Cependant, l'extrait brut conservé à 4°C garde sa stabilité pendant 4 semaines. Au-delà, l'activité coagulante continue à baisser progressivement, pour atteindre un taux de perte d'environ de 54.96% au bout de 8 semaines.

L'étude menée par Hamrani en 2008 a indiqué une baisse d'activité au delà de 21 jours de conservation à + 4 °C pour la pepsine de poulet. Selon Morsli (1996), une perte d'activité coagulante pour la pepsine purifiée du poulet est de 75% lors d'une conservation à 4°C pendant 3 mois contrairement à la conservation à -18°C où la pepsine a gardé une activité coagulante de 100%. La pepsine purifiée du limon a montré une perte d'activité coagulante de 50% au bout de 45^{ème} jour d'entreposage à 4°C.

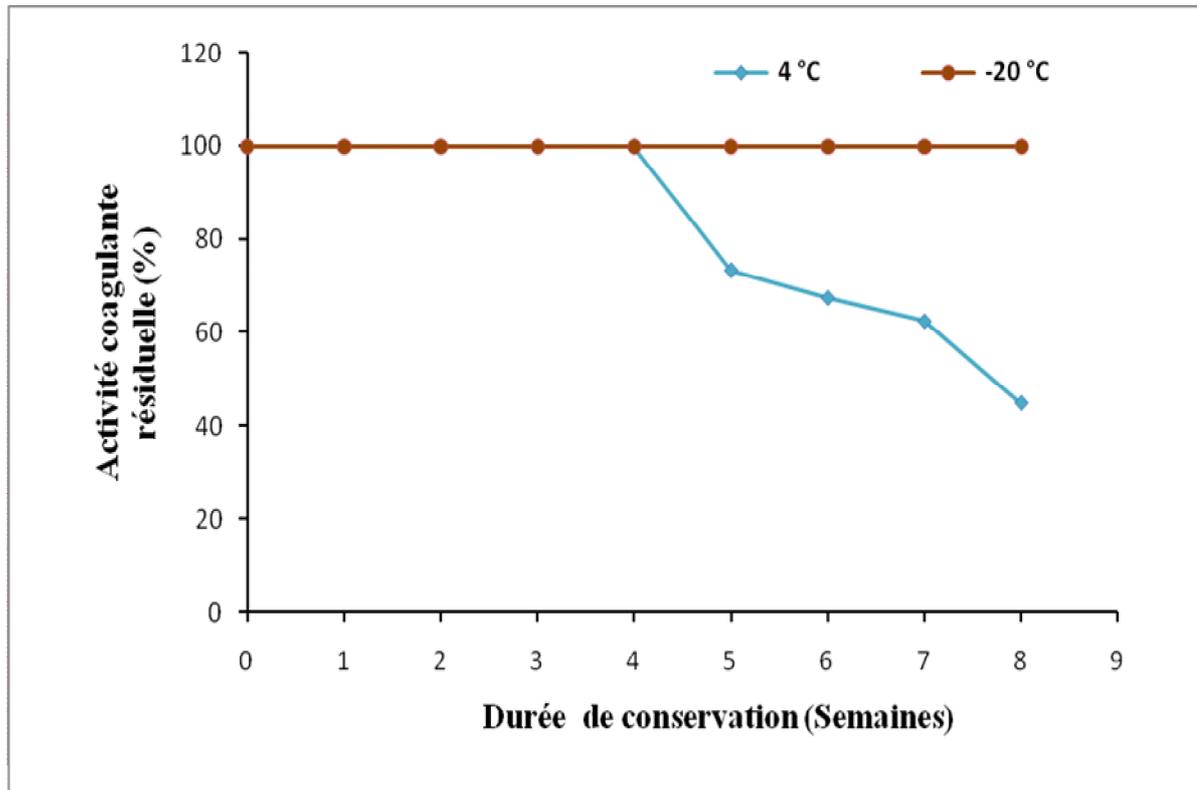


Figure 13: Stabilité de l'extrait pepsique au cours de la conservation

Dans une étude similaire menée sur une protéase d'origine fongique de *Mucor pusillus*, Belhamiche (2005) a signalée une baisse d'activité à partir de 21^{ème} jours de conservation à 4°C et au 28^{ème} jour, l'activité résiduelle été estimée à 82.21%. Par contre, ce même extrait reste stable, au bout de 56^{ème} jours de conservation à -18°C.

Les extraits du cardon et des graines de melon restent stable au cours de la conservation à -18°C (Mouzali, 2001 ; Fernani, 2002).

En général, les enzymes conservées à + 4°C gardent une activité résiduelle qui dépend de l'origine et de la pureté des extraits. De plus, elles se conservent mieux aux basses températures (congélation). Néanmoins, ce procédé est plus coûteux pour une enzyme industrielle.



CONCLUSION

Notre travail a porté sur la possibilité de substituer la présure par l'extrait coagulant de pepsine de poulet *Gallus gallus* (d'origine animale) et visait sa caractérisation. La démarche suivie repose sur deux étapes essentielles. La première consiste en la récupération de la matière première, l'extraction de la pepsine de poulet ; la seconde consiste en la détermination des conditions optimales d'action de cet extrait, par comparaison à la présure animale ; à savoir la détermination de son point d'activité coagulante et les conditions optimales d'action (température, pH, concentration en CaCl_2 et concentration en extrait coagulant) ainsi que l'étude de sa stabilité thermique et au cours de la conservation.

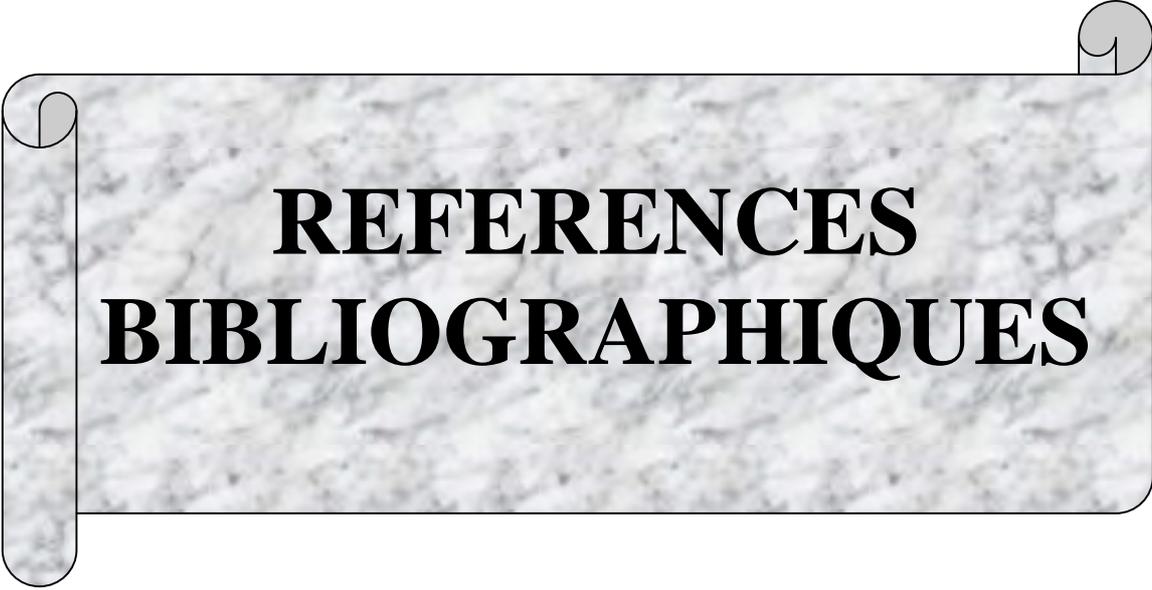
L'extraction a permis d'avoir un extrait pepsique présentant une activité coagulante de 5.55 UP / ml, une teneur en protéines de 18.55 mg/ml. Le rendement d'extraction est estimé à 83.33% et son activité protéolytique est de l'ordre de 52,75 $\mu\text{g/ml}$.

La caractérisation de l'activité enzymatique coagulante de la pepsine de poulet en comparaison avec la présure a montré quelques différences de comportement. En effet, l'activité coagulante est maximale à pH égal à 5,5 pour la pepsine de poulet, à une température 60°C et pour une concentration en chlorure de calcium du lait de 0,04 M. Par ailleurs, l'extrait pepsique est caractérisé par une activité coagulante relativement stable à un intervalle de 30°C à 40°C pendant 30 minutes. En revanche, la conservation de l'extrait coagulant à une température de - 20°C pendant 60 jours permet une meilleure conservation.

A ce stade de l'étude, les résultats mettent en évidence la possibilité d'obtenir un extrait coagulant à partir de proventricules de poulet dont les caractères classiques sont relativement analogues à ceux de la présure traditionnelle, l'exception faite pour la température. Le proventricule de poulet, sous produit de l'industrie avicole, représente une source abondante de protéase coagulant le lait et pourrait donc intervenir, à faible coût, en remplacement de certaines protéases d'origine végétale et microbienne.

En perspective, il s'agit de compléter ce travail par une étude approfondie qui portera sur divers aspects en l'occurrence :

- Etude des facteurs influençant l'extraction afin d'améliorer la qualité de l'extrait et le rendement d'extraction en vue de son utilisation à grande échelle ;
- Purification de l'extrait brut ;
- Envisager l'utilisation de l'enzyme purifiée en technologie fromagère et mener une étude comparative sur la qualité des produits finis.
- Etude socio-économique de production de l'agent coagulant.

A decorative scroll graphic with a light gray marbled background and a black border. The scroll is unrolled in the center, with the top and bottom edges curling upwards and downwards respectively. The text is centered within the unrolled portion.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

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

Alais C. (1974). Dairy science: principles of dairy techniques. 3ème Ed : Sepaic, 808p.

Alais C. (1984). Science du lait. Principes des techniques laitières. 4ème Ed : Sepaic, 814p.

Alamargot J. (1982). Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaire, édition du point vétérinaire-Alfort. 38(2) :130-137.

Aminot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P. et Simpson R. (2002). Composition, propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait in Sciences et technologies du lait. Ecole polytechnique de Montréal, p. 1-69.

Andren A. (2002). Rennets and coagulants in Encyclopedia of Dairy Science. Elsevier, p.281-286.

Anifantakis E.M. et Kandarakis J.G. (1983). Utilisation de la pepsine bovine en fabrication de fabrication Feta fait à partir du lait de brebis. *Le lait* 63:416- 424.

B

Belhamiche N. (2001). Extraction et caractérisation d'une protéase coagulante de *Mucorpusillus*. Mémoire Ingénieur Agronome, I.N.A., El Harrach, 37p.

Belhamiche N. (2005). Extraction, purification et caractérisation de la coagulase de *Mucorpusillus*. Mémoire Magister. Science Agronomique, I.N.A .El Harrach, 58p.

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

Benyahia F. (2013). Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vu de la valorisation des proventricules de volailles au profile de la filière lait en Algérie. Thèse Doctorat, Université de Constantine, 118p.

Berridge N.J. (1954). The purification and chrystallization of rennin. *Biochem.J* 39 :179-186.

Références bibliographiques

- Bohak Z. (1969).** Purification and characterisation of chicken pepsinogen and chicken pepsin *J. biological chemistry* 244(17): 4638-4648.
- Bohak Z. (1970).** Chicken pepsinogen and chicken pepsin. In: *Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes*. Ed., Perlmann G.E and Lorand L, Acad.Press Inc., New York, 19: p347-358.
- Bonino M., Pirpignani L. et Machalinski C. (1999).** Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor sp.* solid-state cultures. *The Journal of peptide research*, 53(6): 599-605.
- Brulé G. et Lenoir J. (1987).** La coagulation du lait in *Le Fromage* Coord. Eck, 2ème Ed. Tec et Doc.
- Brulé G. et Lenoir J. (1990).** Les mécanismes généraux de la transformation du lait en fromage. In : *Fromage*. Coord. Eck, Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris, p.1-21.
- Brulé G., Lenoir J. et Remeuf F. (1997).** La micelle de caséine et la coagulation du lait. In : *Le Fromage*. Coord Eck.A., et Gillis J.(coordonnateurs), 3èmeEd , Lavoisier Tec et Doc, Paris, p 7-41.
- Bruno M.A., Pardo M.F., Caffini N.O. et Lopez L.M.I . (2002).** Purification of a new hieronymi endopeptidase isolated form fruits of *Bromelia Mez (Bromeliaceae)*. *Acta.Farm.Bonaerense* 21(1):51-56.

C

- Cheftel J.C. et Cheftel H. (1977).** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Tec et doc. Lavoisier, 381p.
- Collin J.C., Grappin R. et Legraet Y. (1977).** Etude de la methode de mesure selon Berrigde, du temps de coagulation du lait additionné d'une sollution enzymatique. *Rev. lait* 355: 389-394.
- Creveu-Gabriel I., Gomez J., Caffin J-P., Carre B. (1999).** Comparison of pig and chicken pepsins for protein hydrolysis. *Nutr. Dev*, 39 : 443-454.
- Cuvellier G.F. (1999).** Production des enzymes In : *Biotechnologie*. Goor. Scriban R., 5ème Ed, p. 345- 363.

D

Dalgleish D.G. et Holt C. (1988). A geometrical model to describe the initial aggregation of partly renneted casein micelles. *Journal of colloid and interface science* 123(1):80-84.

Dalgleish D.G. (1993). The enzymatic coagulation of milk. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Springer, Boston, MA. Ed. Godfrey and Wiest, p.135-142.

D'Ambrosio A., Rossanos R., ungaro N. and Riccio P. (2003). proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from the crustaceans *Munida*. *J.Mol.Catalys.B :Enzymatic* 22 :143-146.

Donta S.T. et Van Vunakis H. (1970). Chicken pepsinogens in *Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes*. Ed.,Perlmann G.E. and Lorand L , Acad.Press Inc., NewYork, 19:358-363.

E

Eck A. (1990). Le fromage, Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, 2ème Ed,paris, 539p.

Eck A. et Gillis JC. (2006). Le fromage. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris, 3ème Ed, Paris, 874p.

Ernstrom C.A. (1983).Milk clotting enzymes and their action in fundamentals of dairy Chemistry. In: Coord. WebbB.H., AH. Johnson and J.A. Alford. The Avi Publishing company Inc. 2ème Ed. p 663-718.

F

Fernandez-Lahore H.M., Auday R.M., Fraile E. R., CasconeO., Biscoglio de Jimenez Bonino M., Pirpignani L., et Machalinski C. (1999). Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor sp.* solid-state cultures. *The Journal of peptide research* 53(6) : 599-605.

Fernani L. (2002). Obtention et caractérisation d'une protéase coagulant le lait à partir de graines de melon (*Cucumis melo L.*)Mémoire Magister. En Science Agronomique, INA, El-Harrach.60 p.

Filion M.M. (2006). Amélioration de la stabilité thermique du lait par modulation du potentiel d'oxydoréduction. Thèse Doctorat. Université laval. 159p.

Références bibliographiques

Flotmann B., Pedersen V.B., kauffman D. and Wybrandt G. (1979). The primary structure of calf chymosin. *J. Biol* 254 (17):8447-8456.

Froc J. (2001). Des jus de fruits ou de plantes pour faire du fromage. INRA mensuel, 110 : 41-42.

G

Garnot P. et Martin P. (1980). Présure, composition, activité, son rôle en fromagerie. *Technique Laitière* 930 : 27-30.

Goursand J. (1999). Réacteurs traditionnels à enzymes libres : cas de l'industrie laitière. In : Biotechnologies. Coord Scriban R., 5ème Ed, p. 365-401.

Green M.L. et Stackpoole A. (1975). The preparation and assessment of a suitable *Mucor pucillus* Lindt proteinase – swine Pepsin mixture for cheddar cheese – making. *Journal of dairy research* : 297 – 312.

Green M.L., Valler M.J. and Kay J. (1984). Assesment of the suitability for cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin preparations. *Journal of Dairy Research* 51: 331-340.

H

Haard N. F., Feltham L. A. W., Helbig N. et Squires E. J. (1982). Modification of proteins with proteolytic enzymes from the marine environment: Fermentation of food products. *Advances in Chemistry Series* 198: 223-244.

Hamrani L. (2008). Étude comparative de deux protéases coagulant le lait, extraites de pro ventricules de poulet (*Gallus gallus*) et d'estomacs de limon (*Seriolasp*). Mémoire Magister. Science Agronomique. INA., El-Harrach, 62p.

Horne D. S. (1998). Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal* 8(3):171-177.

Huppertz t., Upadhyayv.k., Kelly A.L. et Tamime A.Y. (2006). Constituents and Properties of Milk from Different Species. Brined Cheeses. Edited by Dr Adnan Tamime. Copyright © 2006 by Blackwell Publishing Ltd, p.1-34.

J

Références bibliographiques

J.o.r.a.n° 69. (2003). Arrêté interministériel du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation. Textes Législatifs. Lait et produits laitiers.

Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P. et Brule G. (2008). Les produits laitiers. Ed.tec et doc, lavoisier, 185 p.

L

Lambert J. C. (1988). La transformation laitière au niveau villageois. Edition : FAO production et santé animales. Rome, 73p.

Larbier M. et Leclercq B. (1992). Nutrition et alimentation des volailles :physiologie digestive. INRA , Paris, 347p .

Lapointe-Vignola C. (2002). Science et technologie du lait: transformation du lait. *Presses internationales Polytechnique.* Canada, 588p.

Llorente B.E., Brutti C.B. and Caffini N.O. (2004). Purification and caractérisation of a milk-clotting aspartic proteinase from globale artichoke (*Cynarascolymus L*).*Journal of agricultural and food chemistry* 52(26): 8182-8189.

Lopez M .B., Jordan M.J., Heellin P . et Laencina J. (1996). Technological suitability of different rennets and coagulant enzymes applied in Murciano-Granadina goat milk. *International Dairy Federation.*

Lucey J. A. (2002). Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science* 85(2) :281-294.

Lucey J. A., Johnson M. E. and Horne D. S. (2003). Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of dairy Science* 86(9) : 2725-2743.

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 Sceince Agronomie. Université de Boumerdès-M'hamed Bougara,65 p.

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

Références bibliographiques

Mahaut M., Jeantet R. et Brulé G. (2003). Initiation à la technologie fromagère : Introduction to cheese making technology. Tec et Doc, Paris.

Martin P., Collin J.C., Carnot P., Ribadean B., Dumas. et Macquot G. (1982). Méthodes d'analyse quantitative des extraits de pressure et pepsine bovine « détermination des teneurs en enzymes actifs » in use of enzymes in food technology. Dupuy P. Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier. Symposium Intern. Versaille, p.287-289.

Martin B. et Coulon J. B. (1995). Milk production and cheese characteristics. 1. Influence of milk production conditions on herd milk clotting ability. *Le lait* 75 (3) : 61 – 68.

Mathieu J. (1998). Initiation à la physicochimie du lait. Lavoisier Tec et Doc. *Journal of Dairy Science*. Elsevier, p.286-293.

Matoub L. (2000). Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33). Mémoire de Magister. Sciences Agronomique. INA El-Harrach.

Mietton B., Desmazeaud M., De Roissart H. et Weber F. (1994). Transformation du lait en fromage. Bactéries lactiques, 2 : 55-132.

Morsli A. (1996). Recherches sur les activités protéasiques de l'extrait de *Cynara scolymus*, du latex de *Ficus carica* et de pro ventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Mémoire de Magister. Sciences Agronomique. I.N.A.El-Harrach.

Mouzali L. (2001). Extraction et caractérisation de l'agent coagulant de la fleur de cardon sauvage (*Cynara cardunculus*).Mémoire de Magister. Science Agronomique. I.N.A. EL-Harrach.

N

Nájera A. I., De Renobales M. et Barron L. J. R. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry* 80(3) : 345-352.

Nouani A. (2009). Recherche de succédanés de la présure traditionnelle utilisés dans la coagulation du lait. Thèse Doctorat en Sciences Agronomiques. I.N.A.El-Harrach, 113 p.

Références bibliographiques

Nouani A., Belhamiche N., Slamani R., Fazouane F., Belbraouet S. and Bellal M. M. (2009). Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Mucor pusillus*: Method comparison. *Europe an Journal of Scientific Research* 35 (4):512-521.

Nouani A., Hamrani L., Bellal M. M. (2011). Purification et caractérisation de protéase coagulant le lait extraite à partir du proventricule de poulet (*gallus gallus*). *African Journal of Biotechnology* 10(9) :1655-1665,

P

Paéz de León L., Pinzón G., and Otaiza E.V. (1995). Purification and assay of chicken pepsin. *Acta científic avenezolana* 46(4):237-241.

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). Study of enzymatic coagulation of camel milk in Saudia-Arabia. Mission Report. FAO.

Ramet J.P. (1990). Les agents de transformation du lait .In : Fromage . Coord . Eck A. Tec.et Doc .Lavoisier , Paris, p.101-105.

Ribadeau-Dumas B. (1991). Physicochimie et biochimie des protéines du lait. Données récentes. *Le Lait* 71(2) : 133-139.

S

Schmidt D. G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. Developments in dairy chemistry. transformation du lait. 3ème Ed. la maison rustique, France, 713 p.

Scott R. (1981). Cheese making practice, Applied Science Publishers, London, p. 4-165.

Scriban R. (1988). Biotechnologie ; 3ème Ed. Tec et doc. p.266-486.

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.

Références bibliographiques

Smeets S.R . (1995). Enzyme coagulation. Dairy technology paper, 5(2) :14-16 .

Sousa M. J. and Malcata F. X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*, 82(2) : 151-170.

T

Terrien M. et Fournier J. (1998). Chimie du petit déjeuner. Ed. Nantes .culture et technique, 304 p.

V

Veisseyre R. (1975). La technologie du lait, constitution, récolte, traitement et transformation du lait. Ed. Maison rustique, 3ème Ed, paris, 696 p.

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

Vignola C.L. (2002). Science et technologie du lait, transformation du lait. Presses internationales polytechnique, Québec, 588 p.

W

Walstra P., Bloomfield VA., Wei GJ. Et Jenness R. (1981). Effet de l'action de la chymosine sur le diamètre hydrodynamique des micelles de caséine. *Biochimica et Biophysica Acta* : Structure de la protéine 669 (2) : 258-259.

Wangoh J., Farah Z. et Puhan Z. (1993). Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract. *Milchwissenschaft* 48: 322-325.

Wigley R. C. (1996). Cheese and whey in industrial enzymologie. In: Coord Godfrey and Wiest. 2ème Ed. Chap. 27:135-142.

Z

Zhao J., Chen S. et Agboola S.O. (2003). Effect of starter culture on the biochemical and sensory properties of ovine cheese manufactured with a plant coagulant. *Australian J. of Dairy Tech* 58 (2) :219.



ANNEXES

Annexe 1

Mesure du temps de coagulation

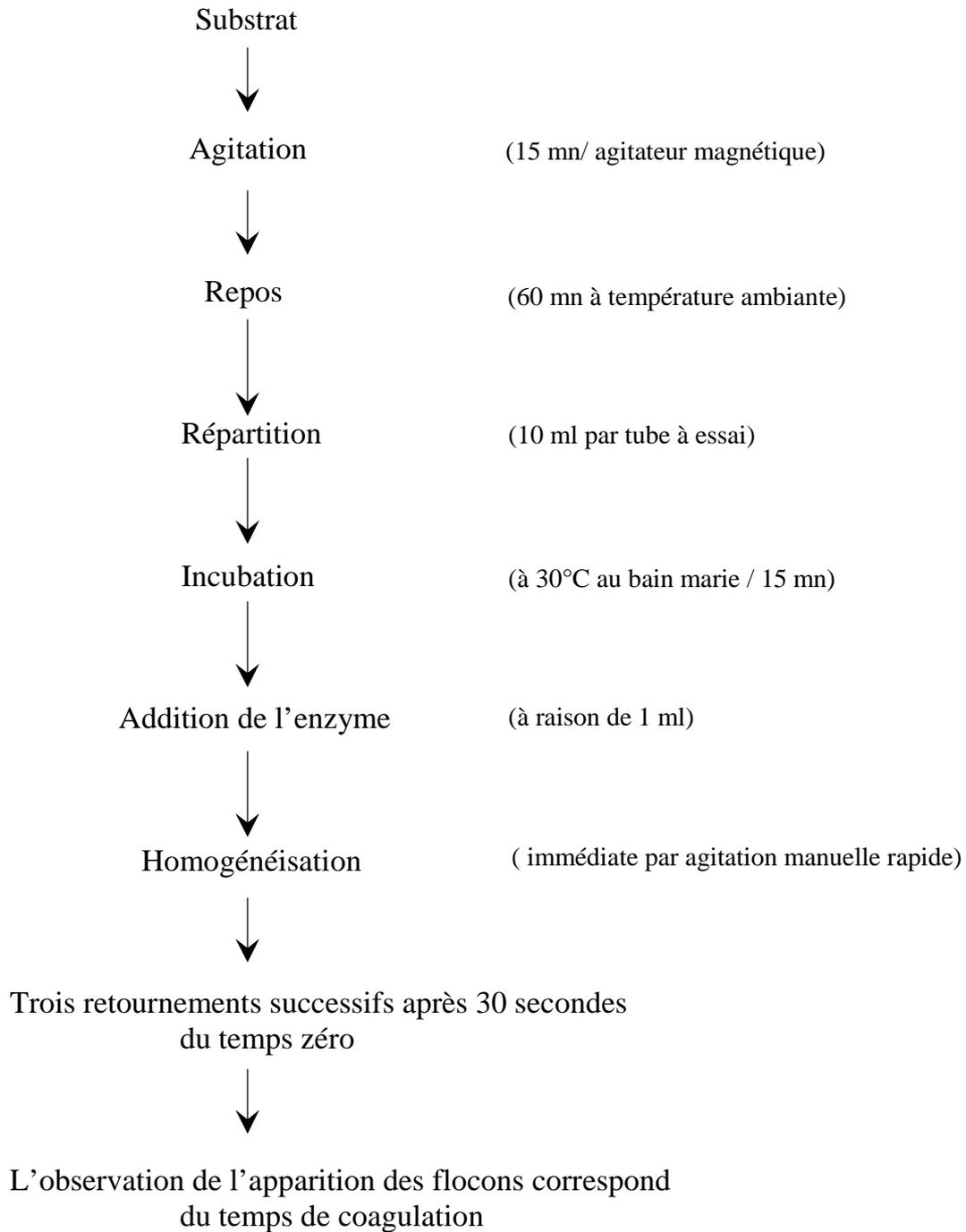


Figure 1 : Mesure du temps de coagulation par la méthode de Berridge (1945) modifiée par Collin et *al.* (1977).

Annexe 2

Activité protéolytique (Green et stackpoole, 1975)

➤ Solution de dosage

- Solution (A) : 1g NaOH dans 250ml d'eau distillée + 5g Na₂CO₃
- Solution (B) : 0.1g sodium-potassium tartrate dans 10 ml +0.032g CuSO₄
- Solutions (C) : 100ml (A) + 2ml (B) (préparation immédiate)
- Solution (D) : Folin dilué ½

Méthode de mesure

* Courbe étalon de tyrosine

- Préparer des solutions diluées de concentrations croissantes : 20, 40, 60, 80 et 100 µg /ml à partir d'une solution- mère de tyrosine (100 µg /ml). Le tube témoin contient 1 ml d'eau distillée.
- Ajouter dans chaque tube 5 ml de la solution (C).
- Incuber pendant 10 mn. à 35°C au bain- marie.
- Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de la solution (D) et agiter fortement.
- Laisser incuber 20 mn à 35°C.

* Conditions d'hydrolyse

- Ajouter 1 ml de la solution enzymatique à 1 ml de la solution de caséine à 2 % (P/ V) dans le tampon citrate de sodium pH 5,2.
- Incuber pendant 20 mn. à 35°C.
- Après incubation, ajouter 5 ml de T.C.A. (12 %) (P/V).
- Laisser reposer 15 mn.
- Filtrer à travers du papier filtre.

* Préparation de l'échantillon

- A 1 ml du filtrat, ajouter 5 ml de la solution (C) puis mélanger.
- Incuber pendant 10 mn à 35°C.
- Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de la solution (D) et agiter immédiatement.
- Incuber à 35°C pendant 20 mn.

* Préparation du blanc

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

* Lecture de l'absorbance

La lecture de la densité optique est effectuée à 660 nm après avoir étalonner le spectrophotomètre avec le témoin.

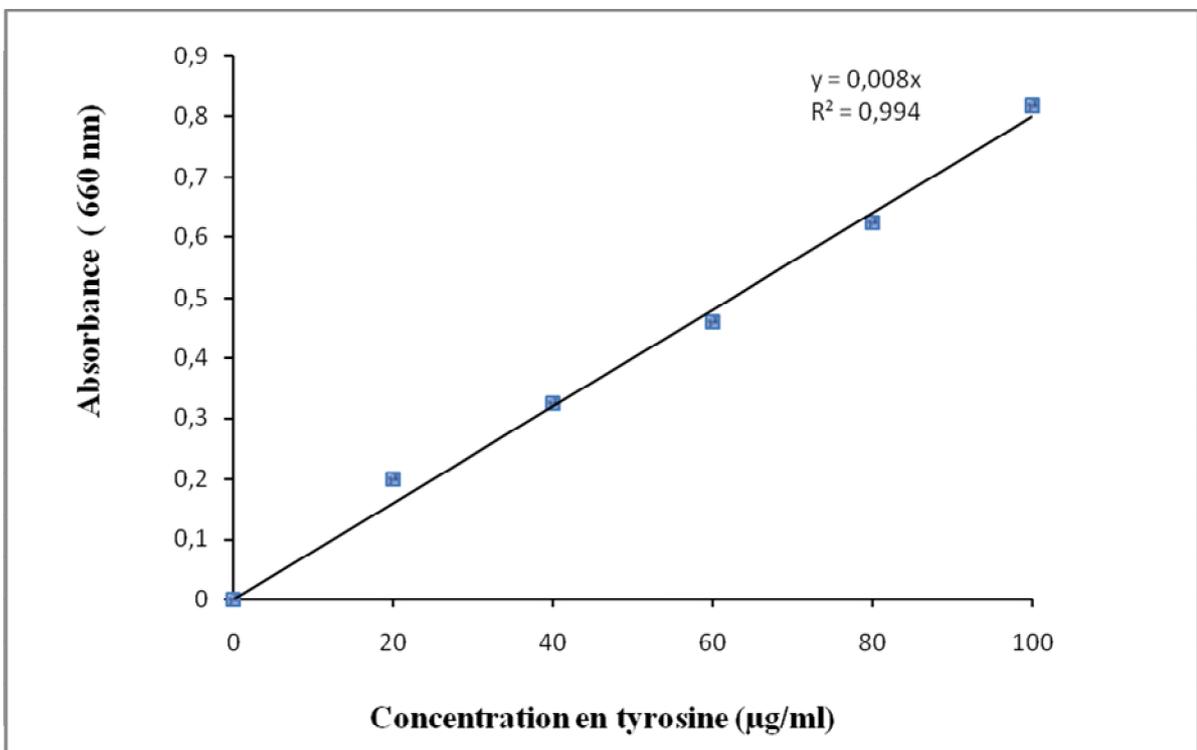


Figure 2 : Courbe étalon de la Tyrosine

Annexe 3

Dosage des protéines (Lowry et *al.*, 1951)

➤ Solution de dosage

- Solution (A) : 5% Na_2CO_3 .
- Solution (B) : 0.5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 1% sodium-potassium tartrate.
- Solution (C) : 50 ml(A) + 2ml (B) (préparation immédiate)
- Solution (D) : NaOH (1N).
- Solution (E) : Réactif de Folin-Ciocalteu dilué $\frac{1}{2}$

Méthode de mesure

- Courbe étalon de B.S.A.

- Préparer des solutions diluées de concentrations croissantes : 25, 50, 75, 100, 150 et 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ à partir d'une solution- mère de B.S.A. (200 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Le tube témoin contient 0,5 ml d'eau distillée.
- Ajouter dans chaque tube 0,5 ml de la solution (D) puis 2,5 ml de la solution (C).
- Laisser reposer pendant 10 mn.
- Ajouter 0,5 ml de la solution (E).
- Incuber pendant 30 mn. à l'obscurité.

- Lecture de l'absorbance

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

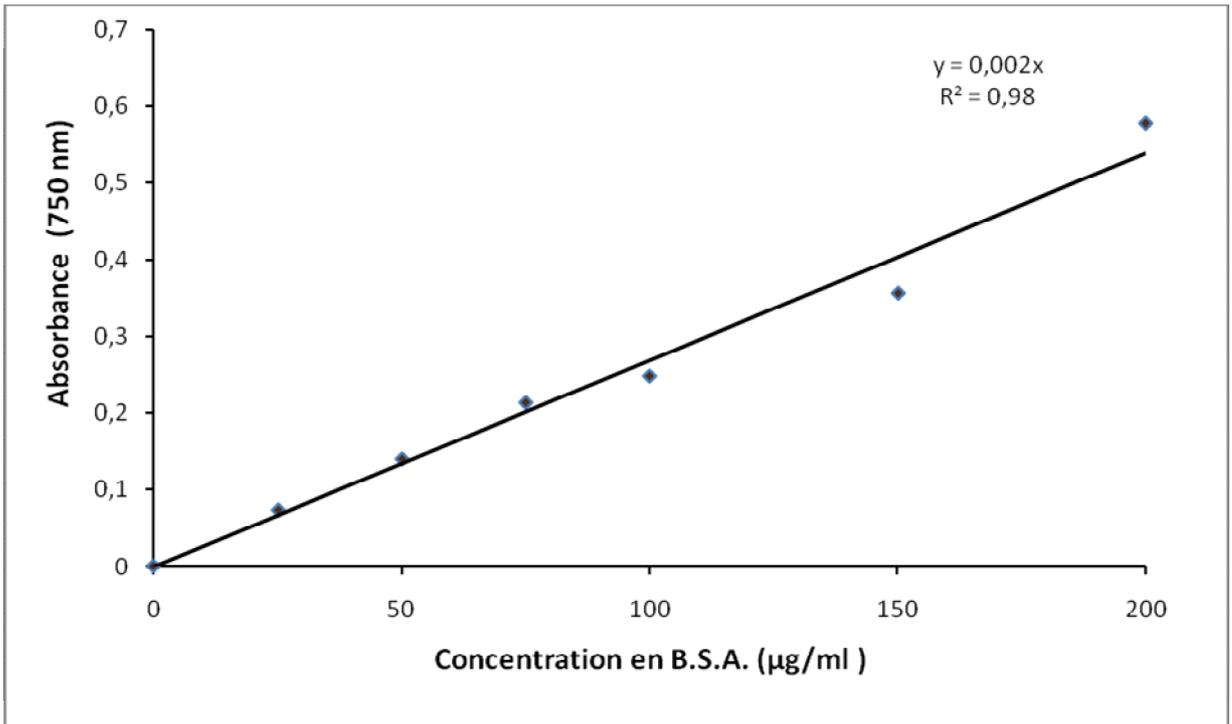


Figure 3 : Courbe étalon de la B.S.A.

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier la possibilité de substituer la présure par la pepsine de poulet comme agent coagulant du lait.

La pepsine du poulet, a été obtenue par macération de proventricules de poulet haché (*Gallus gallus*). L'extrait obtenu se caractérise par une activité coagulant de l'ordre de 5.55 UP/ml.

Les conditions optimales d'activité coagulante ont été déterminées. L'activité est maximale à une température de 60 °C, à pH 5.5 et pour une concentration en CaCl₂ du lait de 0.04 M.

L'enzyme est relativement stable dans l'intervalle de 30°C à 40°C après 30 min d'incubation ainsi qu'aux basses températures.

Ces propriétés sont relativement similaires à ceux de la présure d'origine animale, exception faite pour la température.

Mots-clés : pepsine de poulet, proventricule, caractérisation, coagulation du lait, présure.

Abstract

The aim of this work is to study the possibility of substituting rennet with chicken pepsin as a coagulating agent for milk.

The chicken pepsin, coagulating the milk, was obtained by maceration of ground chicken proventricula (*Gallus gallus*). This enzyme is characterized by a coagulating activity of about 5.55UP.

Optimal conditions of coagulant activity were determined. The activity is maximum at a temperature of 60 ° C, at pH 5.5, and for a 0.04M CaCl₂ concentration.

The enzyme is relatively stable in the range of 30 ° C to 40 ° C after 30 minutes of incubation and at low temperatures of conservation.

These properties are relatively similar to those of rennet, except for the temperature.

Keywords: chicken pepsin, proventriculus, characterization, milk coagulation, rennet.