

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université A. MIRA-BEJAIA**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département des Sciences Alimentaires**  
**Spécialité Production et transformation des produits laitiers**



Réf :.....

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

**Thème**

**Recherche des succédanés de la présure d'origine animal et végétal (Poulet et camomille)**

Présenté par :

**AIT SAIDI KAHINA ET AGUENIHANAI NAOUEL**

**Devant le jury composé de :**

Mme. ADJEROUD-ABDELLATIF N.	MCB, Univ. Béjaïa	Présidente
Mr. BOUKHALFA F.	MCA, Univ. Béjaïa	Encadreur
Mme. BRAHMI N.	MCA, Univ. Béjaïa	Examinatrice

**Année universitaire : 2021/2022**

## Remerciements

*Avant tout nous adressons nos remerciements à ALLAH, notre Dieu qui nous a aidé et celui qui nous a donné la force, la patience et le courage pour pouvoir réaliser ce travail en disant « Dieu Merci ».*

*Nos remerciements s'adressent en premier lieu à notre promoteur Mr BOUKHALFA Farid, pour le sujet et le temps qu'il nous a attribué et d'avoir accepté de diriger notre travail, pour ses précieux conseils et orientations, sans oublier sa patience.*

*Nous exprimons nos respectueux remerciements à Mme ADJEROUD Nawel d'avoir accepté de présider le jury et Mme BRAHMI Nabila d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*J'exprime ma reconnaissance à tous le personnel de la laiterie SOUMMAM et du laboratoire de contrôle physico chimiques, à leur tête Mme MAHLOUL Malika, Mr TAALBA Salim et Mr HAMITOUCHE Brahim et Mr DJAAFRI Brahim pour leur aide technique et scientifique ainsi que pour leur disponibilité et gentillesse.*

*Enfin, on a une pensée particulière pour nos parents, nos frères et nos sœurs qui nous soutiennent dans tous nos projets et nos études.*

*Je dédie ce travail à*

*Allah, le clément, le Miséricordieux ; nous rendons grâce à Allah le tout puissant qui nous a permis de voir ce jour solennel.*

*A mes parents :*

*Aucune dédicace ne serait exprimer mon grand amour, mon estime, ma reconnaissance et ma profonde affection, je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi et ce que vous faites jusqu'à présent, que dieu vous garde et vous accorde longue vie. A mes chers frères : Mabrouk, Foufou*

*A ma chère sœur : Ghania*

*A mon petit ange Yanis qui forme le charme de la vie*

*A mes cousines et cousins*

*A mes amies : Kahina, Lynda, Sonia, Ines, Amina, Mira, Bida, Nacera*

*A tout ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.*

*Que Dieu vous protège tous.*

*NAOUEL*

*Je dédie ce travail à*

*Allah, le clément, le Miséricordieux ; nous rendons grâce à Allah le tout puissant qui nous a permis de voir ce jour solennel.*

*A mes chers parents et mon fiancé Oualid :*

*Aucune dédicace ne serait exprimer mon grand amour, mon estime, ma reconnaissance et ma profonde affection, je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi et ce que vous faites jusqu'à présent, que dieu vous garde et vous accorde longue vie.*

*A mes chers frères : Mohammed, Saïd et Yanis*

*A mes chers sœur Karima et Naima et belles sœurs*

*A mes petits anges Amine, Aylane, Bilal qui forme le charme de la vie*

*A ma belle-famille*

*A mes amies de promo PTL : Ines, Nacera, Amina, Sonia, Bida, Mira  
copines proche : Naouel, Lynda*

*A tout ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.*

*Que Dieu vous protège tous.*

**KAHINA**

---

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau I :** Composition moyenne du lait de vache ..... 04

**Tableau II :** Caractéristiques physico-chimiques de extraits enzymatiques étudiés..... 23

---

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01</b> : Structure en éponge de la micelle de caséine .....	<b>05</b>
<b>Figure 02</b> : Schéma récapitulatif du processus de coagulation mixte .....	<b>07</b>
<b>Figure 03</b> : Coagulation du lait lors de la première phase enzymatique (par la présure) .....	<b>08</b>
<b>Figure 04</b> : Photographie des différentes étapes nécessaires pour l'obtention de l'extrait Enzymatique .....	<b>14</b>
<b>Figure 05</b> : Schéma représentatif de l'appareil digestif du poulet .....	<b>15</b>
<b>Figure 06</b> : Photographie des pro-ventricules de poulet .....	<b>14</b>
<b>Figure 07</b> : Schéma représentatif des opérations d'extraction de l'extrait brut de Proventricule .....	<b>16</b>
<b>Figure 08</b> : Schéma représentatif des opérations de clarification de l'extrait brut de proventricule .....	<b>17</b>
<b>Figure 09</b> : Photographie du résultat obtenu de l'estimation de la force coagulante.....	<b>24</b>
<b>Figure 10</b> : Teneur en protéines des extraits enzymatiques étudiés .....	<b>25</b>
<b>Figure 11</b> : Résultats de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques étudiés .....	<b>26</b>
<b>Figure 12</b> : Photographie représente l'activité coagulante des extraits.....	<b>26</b>
<b>Figure 13</b> : Résultats d'estimation de l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés .....	<b>27</b>
<b>Figure 14</b> : Variation de l'activité coagulante des extraits en Fonction du potentiel d'hydrogène(pH) .....	<b>28</b>
<b>Figure 15</b> : Effet de la température du substrat sur l'activité coagulante .....	<b>29</b>
<b>Figure 16</b> : Effet de la concentration en CaCl <sub>2</sub> du substrat sur l'activité coagulante .....	<b>31</b>
<b>Figure 17</b> : Effet de la concentration des extraits enzymatiques sur l'activité coagulante ...	<b>32</b>

---

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**CMP** : Caséino-Macro-Peptide.

**EST** : Extrait Sec Total

**FAO** : Food and Agriculture Organisation (Organisation pour l'alimentation et l'agriculture)

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

**MG** : Matière Grasse

**MS** : Matière Sèche

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**U.A.C.** : Unité d'Activité Coagulante

**UP** : Unité de Présure.

---

# Table des matières

*Remerciement*

*Dédicace*

*Liste des tableaux*

*Liste des figures*

*Liste des abréviations*

**Introduction**.....01

## Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le lait .....	03
1. Composition du lait .....	03
1.1. Protéines .....	04
1.1.1. Caséines.....	04
1.1.2. Protéines hydrosolubles.....	05
1.2. Fraction minérale.....	05
2.Coagulation du lait .....	06
2.1. Définition .....	06
2.2. Différents types de coagulation .....	06
2.2.1. Coagulation acide.....	06
2.2.2. Coagulation mixte.....	06
2.2.3. Coagulation enzymatique.....	07
2.2.4. Etapes de coagulation.....	07
2.2.4.1. Phase primaire .....	07
2.2.4.2. Phase secondaire.....	08
2.2.4.3. Phase tertiaire .....	08
3.Caractéristiques des différents gels obtenus par la coagulation acide et enzymatique.....	09
4.Facteurs de la coagulation.....	09
5.Présure.....	09
5.1. Succédanés de la présure .....	10
5.1.1. Succédanés d'origine animale.....	10



---

5.1.2 . Succédanés d'origine végétale .....	11
5.1.3. Succédanés d'origine microbienne.....	11

## **Matériels et méthodes**

1. Matériel végétal .....	13
1.1. Extraction de la camomille .....	13
2. Matériel animal .....	14
2.1. Proventicules de poulet .....	14
2.2. Préparation des proventicules.....	15
2.3. Extraction de la pepsine .....	16
3. Préparation de l'extrait enzymatique de présure .....	17
4. Teneur en protéine .....	17
5. Mesure de l'activité enzymatique.....	18
5.1. Evaluation de l'activité coagulante.....	18
5.1.1. Mesure du temps de floculation .....	18
5.1.2. Activité coagulante.....	18
5.1.3. Evaluation de l'activité protéolytique .....	19
6. Force coagulante.....	20
7. Caractérisation partielle de l'extrait enzymatique brut.....	21
7.1. Détermination de la température optimale d'activité .....	21
7.2. Influence de pH du lait.....	21
7.3. Détermination de la concentration optimale de CaCl <sub>2</sub> .....	21
7.4. Influence de la concentration en extrait enzymatique .....	22

## **Résultats et discussion**

1. Caractéristiques physico-chimiques des extraits enzymatiques .....	23
2. Caractérisation de l'activité enzymatique des extraits.....	23
2.1. Rendement de l'extraction .....	23
2.2. Potentiel d'hydrogène des extraits enzymatiques.....	24
2.3. Force coagulante.....	24
2.4. Dosage des protéines des extraits enzymatiques .....	24
2.5. Détermination de l'activité protéolytique .....	25
2.6. Détermination de l'activité coagulante .....	26

---

3. Détermination des conditions optimales de coagulation .....	27
3.1. Effet du ph.....	27
3.2. Effet de température.....	29
3.3. Effet de la concentration en chlorure de calcium sur l'activité des extraits étudiés.....	31
3.4. Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante des extraits brut .....	32
<b>Conclusion</b> .....	34

# *Introduction*

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (**Bergmeyer et al., 1979 ; Pelmont, 1995 ; Drouin, 2005**). En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (**Patel et al., 2005**) ; la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (**Leisola et al., 2001**). Les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés (**Sandhya et al., 2005a**).

Consommé depuis 12 000 ans, le lait est un aliment biologique qui présente un intérêt nutritionnel (**Ghaoues, 2011**), grâce à la richesse de sa composition et la variété de ses constituants. Il est un aliment qui se distingue par une forte concentration en nutriments (**Vilain, 2010 ; Gibson et Williams, 2000**) à l'état naturel contenant plusieurs éléments nutritifs indispensable. Sa valeur énergétique est de 700Kcal/L. Le lactose est le sucre prédominant dans le lait, connu pour jouer un rôle important dans la formation et la croissance du système nerveux des mammifères (synthèse de galactoside). La haute qualité nutritionnelle des protéines du lait repose sur leur forte digestibilité et leurs compositions particulièrement bien équilibrée en acides aminés indispensables (**Derby, 2001**).

Le lait est également une excellente source de minéraux intervenant dans divers métabolismes humains notamment comme cofacteurs d'enzymes. Il assure aussi un apport non négligeable en vitamines, elles aussi comme facteurs essentiels intervenant dans les réactions du métabolisme. Cependant, il est néanmoins pauvre en fer et en cuivre et il est dépourvu de fibres (**Cheftel et Cheftel, 1996**).

La transformation du lait permet d'obtenir une très vaste gamme de produits dérivés Non seulement le lait se consomme à l'état nature, il peut également subir différentes biotransformations qui contribuent à élargir considérablement ses qualités sensorielles et nutritionnelles. L'un des dérivés de ces transformations est le fromage. (**St-Gelais et TirardCollet, 2002**). L'intérêt majeur de la transformation du lait en fromage était de conserver les constituants du lait, la coagulation de lait est l'étape clé de la fabrication d'un fromage, selon (**Eck et Ghili, 2006**), elle consiste à la formation d'un gel sous l'action d'enzymes protéolytiques

et (ou) d'acide lactique, suit à des modifications physico-chimiques intervenants sur les micelles de caséines.

La présure est un coagulant du lait d'origine animale extrait de la caillette de jeunes ruminants avant sevrage, elle est composée de deux enzymes la chamoisine et la pepsine c'est la plus employée pour la coagulation du lait nécessaire à la fabrication des fromages (**Guevara et Raul, 2018**).

Depuis quelques années de nombreux facteurs ont favorisé les recherches de succédanés de la présure de différentes origines (animales, végétales et microbiennes) en vue de la fabrication du fromage. Parmi ces facteurs, il faut citer le prix relativement élevé des préparations commerciales de présure et l'enzyme protéase qui est un ingrédient clé de la coagulation du lait pendant la technologie de fabrication du fromage ce dernier il est en crise en face à l'approvisionnement en présure animale suite à l'obligation d'éviter l'abattage de veaux de lait, source la plus importante de présure animale et les ressources en quantités limitées d'estomacs de ruminants, les régimes alimentaires tels que le lacto-végétarisme, les restrictions religieuses (cashier et halal par exemple) ou l'interdiction de la présure de veau recombinante dans de nombreux pays européens (France, Allemagne et Pays-Bas).

L'objectif de ce travail est la contribution à la recherche des succédanés de présure utilisables industriellement et la possibilité de substituer la présure, valoriser la coagulation du lait par la caractérisation de l'extrait clarifié de la pepsine et de l'extrait brut de la camomille et faire la comparaison entre eux.

Afin d'atteindre l'objectif tracé, ce travail est divisé en deux parties. La première est une étude bibliographique et la seconde est une partie pratique divisée en deux sections, à savoir matériel et méthode et discussion des résultats. Dans la partie bibliographie, un aspect générale est donné pour les deux principaux volets ; généralités sur le lait, les différents types de coagulation enzymatique du lait. Au cours de la partie pratique, la collecte des matières premières (poulet, camomille), extraction et caractérisation et comparaison avec la présure, et l'étude des différents résultats obtenus des paramètres physicochimiques de la poudre de lait ainsi que les résultats de coagulation par les trois extraits enzymatiques.

L'étude est finalisée par une conclusion générale et des perspectives pour compléter la présente étude.

*Synthèse*  
*Bibliographique*

### **I. Généralités sur le lait**

Selon le journal officiel de la république démocratique algérienne, la dénomination « Lait » est réservée exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale, obtenue par une ou plusieurs traites sans aucune addition ou soustraction et n'ayant pas été soumis à un traitement thermique (**J.O.R.A, 2003**).

Le lait de vache est un liquide opaque, blanc mat, d'autant plus jaune qu'il est plus riche en crème, doué d'une odeur identifiable peu accentuée et d'une saveur légèrement sucrée (**FAO/OMS, 2009**).

Le lait est un substrat très riche fournissant à l'homme et aux jeunes mammifères un aliment presque complet : protides, glucides, lipides, sels minéraux et vitamines, qui sont présents à des concentrations satisfaisantes pour la croissance et la multiplication cellulaire (**Kassa et al.,2016**).

Le lait est l'élément de base des produits laitiers, comme le fromage, le beurre, le yaourt. Et est souvent utilisé dans l'industrie agroalimentaire comme ingrédient (en pâtisserie, biscuiterie, charcuterie).

#### **1. Composition du lait**

La composition moyenne du lait de vache (**tableau I**) fait apparaître les grandes catégories des constituants du lait : eau, lactose, matière grasse, protéines et les constituants salins mais ne révèle pas la multitude de ses substances et la complexité de sa composition. Ainsi que d'autres éléments qui sont les enzymes et les vitamines. La composition générale du lait de vache est variable selon, la race de l'animale, la période de lactation, l'alimentation, la saison et l'âge de l'animal (**Alais et al., 2008 ; Amiot et al., 2002**).

**Tableau I :** Composition moyenne du lait de vache (Alais et al., 2008)

Composants	Concentration (g /l)
Eau	<b>905</b>
Glucides	<b>49</b>
Lipides (matière grasse)	<b>35</b>
Protides caséine protéines substances azotées non protéiques	<b>34</b>
Sels minéraux	<b>09</b>
Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz)	<b>Traces</b>
Extrait sec total	<b>127</b>
Extrait sec non gras	<b>92</b>

### **1.1. Protéines**

Différentes structures et propriétés physicochimiques distinguent les protéines du lait. On les classe en deux catégories d'après leur solubilité dans l'eau et leur stabilité (Amiot et al., 2002) :

#### **1.1.1. Caséines du lait**

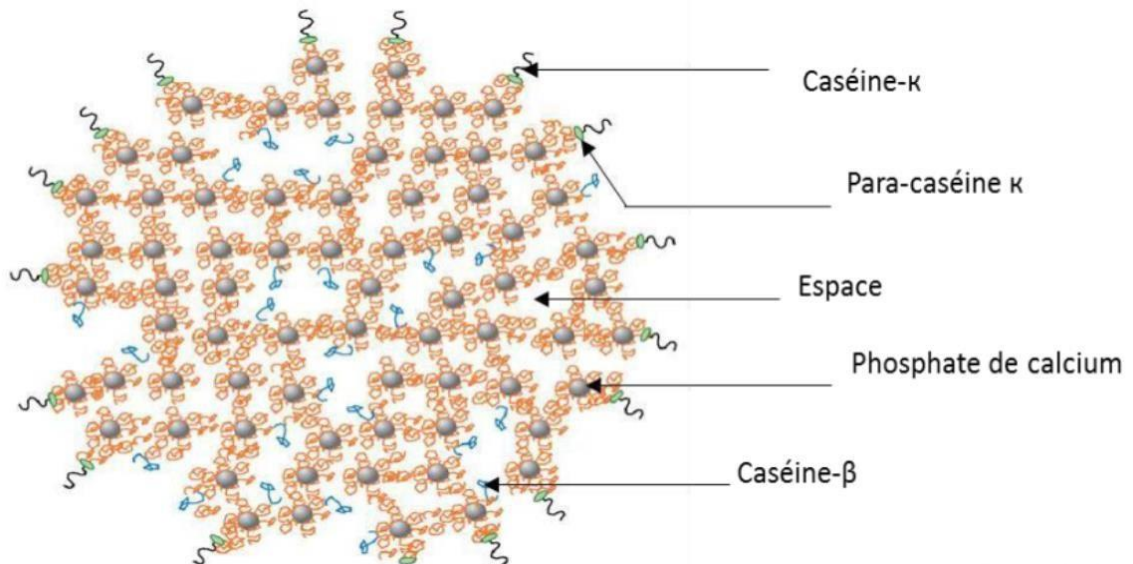
Les caséines forment près de 80 % de toutes les protéines présentes dans le lait. Elles sont en suspension colloïdale, se regroupent sous forme de micelles et précipitent sous l'action de la présure ou lors de l'acidification à pH d'environ 4,6 (Alais et al., 2003). Les caséines sont classées en quatre espèces principales :

- Les caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , beta qui constituent respectivement 31, 12 et 23 % des protéines, contiennent 199, 207 et 209 résidus d'acides aminés ;
- La caséine k, qui représente 13 % des protéines, contient 169 résidus d'acides aminés. Elle a un rôle exceptionnel car, soluble à toutes les températures en présence de calcium, elle stabilise les autres caséines et permet la formation de micelles stables.

La micelle de caséine est une particule sphérique formée par l'association des caséines ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , beta et k), de quelques fragments peptidiques (les caséines  $\gamma$ ) issus de la protéolyse de la caséine beta par la plasmine et de composants salins dont les deux principaux sont le calcium et le phosphore (Dalglirish et Corredig, 2012).



La micelle serait constituée d'un ensemble de sous-unités ou submicelles, de nature exclusivement protéique et de composition variable. Ces sous-unités s'agrègent entre elles par l'intermédiaire du calcium et du phosphate minéral. L'agrégation est favorisée par la présence des sites phosphoséryls localisés à l'extérieur des submicelles ; ceux-ci présentent en effet une très grande affinité vis-à-vis du calcium et du phosphate de calcium (Marchin *et al.*, 2007).



**Figure 01** : Structure en éponge de la micelle de caséine (Dalglish et Corredig, 2012)

### 1.1.2. Protéines hydrosolubles

Dites protéines du lactosérum, se retrouvent sous forme de solution colloïdale. Les deux principales sont la  $\gamma$ -lactoglobuline (environ 55 %) et l' $\alpha$ -lactalbumine (environ 22 %) ; les autres protéines sont les immunoglobulines (environ 13 %), le sérum albumine bovine (SAB) (environ 7 %) et la lactoferrine (environ 4 %). En plus, différents enzymes sont présents dans le sérum (Zikiou, 2013).

A leur pH isoélectrique, les protéines du lactosérum restent solubles contrairement à la plupart des protéines ; elles vont donc migrer avec le lactosérum lors de la coagulation du lait, elles précipitent sous l'action de la chaleur (Zikiou, 2013).

### 1.2. Fraction minérale

Les minéraux du lait se trouvent sous deux formes principales, surtout sous forme de sels ionisés et solubles dans le sérum et sous forme micellaire insoluble (Libouga *et al.*, 2013). Les

minéraux du lait représentent une fraction mineure du lait (environ 7-8g/l) par rapport aux fractions protéiques (35-40g/l), lipidique (37-42 g/l) ou glucidique (50g/l). Ces minéraux se répartissent en cations (calcium, magnésium, sodium, potassium) et en anions (chlorure, phosphore et citrate).

Dans le lait ces minéraux sont libres ou associés entre eux pour former des sels ou associés à des protéines. Ces associations varient en fonction des conditions physico-chimique et technologiques.

## **2. Coagulation du lait**

### **2.1. Définition**

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

### **2.2. Différents types de coagulation**

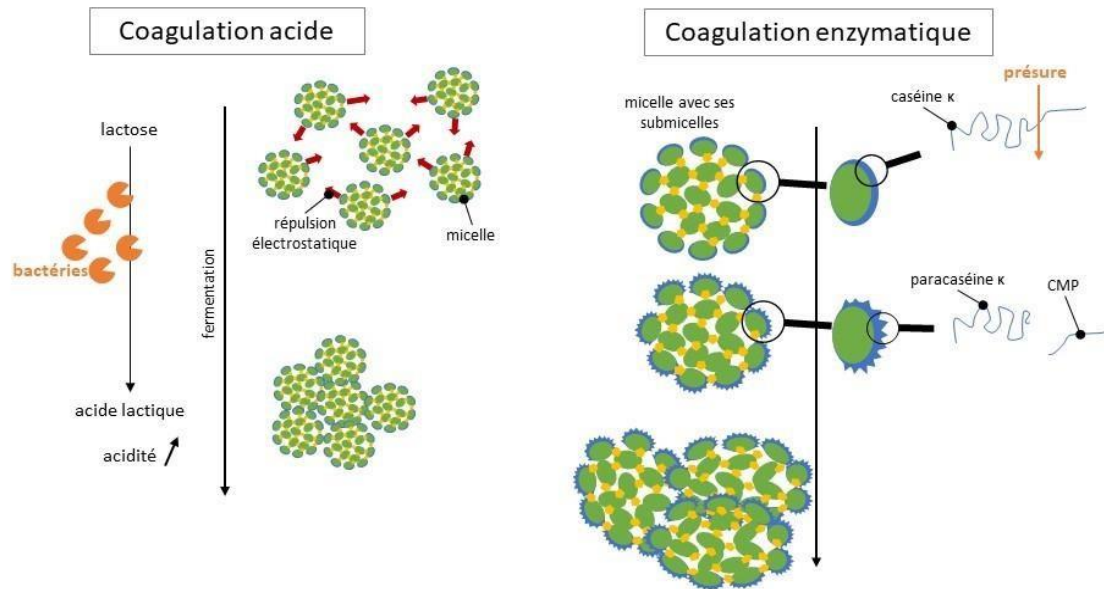
#### **2.2.1. Coagulation acide**

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ( $\text{pI} = 4,6$ ) par acidification biologique à l'aide des ferments lactiques qui fermentent le lactose en acide lactique, ou par acidification chimique l'addition d'un agent acidogène (glucono- $\delta$ -lactone) ou ajout de protéines sérique à pH acide. Le gel obtenu par acidification présente une bonne perméabilité mais une friabilité élevée. Le manque de structuration du réseau a pour conséquence une élasticité et une plasticité pratiquement nulle et une faible résistance aux traitements mécaniques (**Abdellaoui, 2007**).

#### **2.2.2. Coagulation mixte**

La coagulation mixte est réalisée par acidification du lait et adition des enzymes coagulantes. En pratique cette méthode est utilisée pour la fabrication des fromages frais ou fromages à pâte molle (**boughellout, 2007**).

Le coagulum obtenu présente des caractères intermédiaires entre ceux du gel lactique et présure. Il est caractérisé par une souplesse et une élasticité moins grande, une fermeté et friabilité plus accentuées que celle du gel présure (**Jeantet et al., 2008**).



**Figure 02 :** Schéma récapitulatif du processus de coagulation mixte (**Jeantet et al., 2008**)

### 2.2.3. Coagulation enzymatique

La coagulation du lait par des enzymes protéolytiques est une des plus anciennes opérations de transformation alimentaire. Un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou microbienne, présente la propriété de coaguler le complexe caséinique (**Kellil, 2015**).

La présure est l'enzyme coagulante la mieux connue et son mécanisme d'action est bien établi. Le processus de coagulation est influencé par la température, l'acidité et la teneur en calcium.

La coagulation, provoquée par la présure, résulte d'un processus en trois phases :

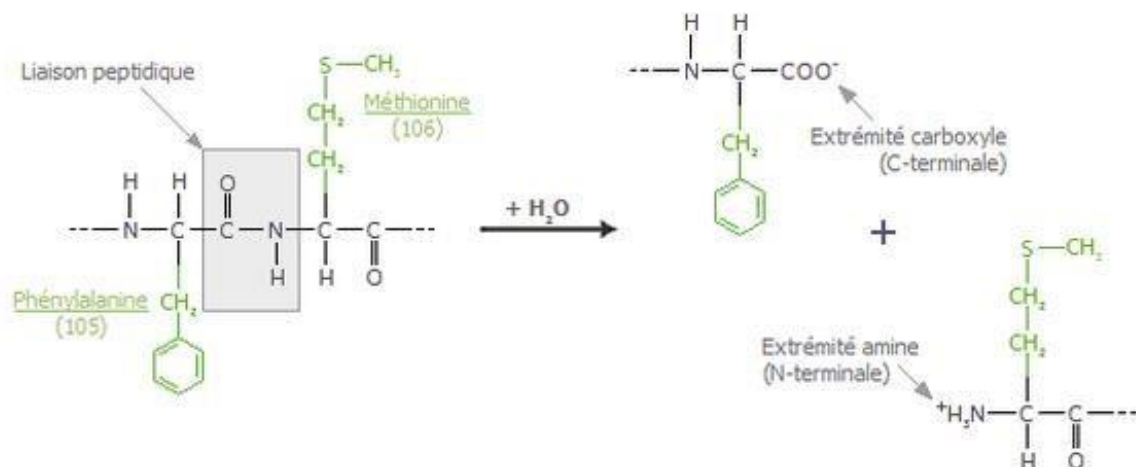
- Phase primaire ou enzymatique ;
- Phase secondaire ou phase d'agrégation des micelles déstabilisées ;
- Phase tertiaire ou phase de développement du réseau par réticulation et formation de gel (**Corredig et Salvatore, 2016**).

## 2. 2.4. Etapes de coagulation

### 2.2.4.1. Phase primaire

La micelle est principalement constituée de caséine  $\kappa$  avec son segment C-terminal hydrophile libre qui s'étend dans la phase aqueuse du lait assurant la stabilité stérique et agissant comme une barrière contre l'association des micelles (Corredig et Salvatore, 2016).

Au cours de la phase enzymatique (primaire), il y'a une attaque de l'enzyme sur la caséine- $\kappa$  (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- $\kappa$  (Fig. 03) et le segment 106-169 qui est le caséinomaclopeptide (CMP). La paracaséine- $\kappa$  liée aux caséines  $\alpha$  et  $\beta$  reste intégrée à la micelle hydrophobe et le CMP contenant tous les glucides est libéré dans le lactosérum, ce qui entraîne une réduction de la charge négative et leurs degrés d'hydratation.



**Figure 03** : Coagulation du lait lors de la première phase enzymatique (par la présure) (Corredig et Salvatore, 2016).

### 2.2.4.2. Phase secondaire

Cette phase commence dès que 85 % de la caséine- $\kappa$  est hydrolysée. Elle est dite phase d'agglomération ou d'agrégation ou phase de coagulation proprement dit (Lucey, 2002). Durant laquelle la libération du maclopeptide de la caséine- $\kappa$  sous l'action de l'enzyme entraîne la réduction des répulsions électrostatiques entre les micelles de caséines hydrolysées. L'élimination

de ces macropeptides entraîne également une réduction du diamètre hydrodynamique et une perte de la stabilité (**Mahaut, 2003**).

La nature des interactions intervenant durant cette phase n'est pas encore bien connue. Les micelles déstabilisées s'agrègent en présence des ions de calcium libres ( $\text{Ca}^{++}$ ). Au début, il y'a une formation de chaînes linaires de micelles qui continuent de s'agréger pour former des amas. Ces derniers constituent le gel protéique qui se sépare nettement de lactosérum (**Lucey, 2002**).

### **2.2.4.3. Phase tertiaire**

Durant cette phase, les micelles agrégées subissent une profonde réorganisation par la mise en place de liaisons phosphocalciques et peut être de ponts disulfures entre les para caséines (**Ronez, 2012**).

## **3. Caractéristiques des différents gels obtenus par la coagulation acide et enzymatique**

- Propriétés de coagulum obtenu par voie enzymatique : Le gel présure est rigide, de grande cohésion, contracté et imperméable.
- Propriétés de coagulum obtenu par voie acide : Le coagulum formé par voie acide possède des propriétés rhéologiques caractéristiques : il est friable, peu élastique, son raffermissement est très limité et très long, sa porosité est bonne, sa perméabilité élevée, mais son aptitude à l'égouttage est limitée (**Jeantet et al., 2017**).

## **4. Facteurs de la coagulation**

Plusieurs facteurs interviennent dans la coagulation du lait parmi eux : la concentration en enzyme, la température et le potentiel d'hydrogène du lait, la composition du lait (Teneur en calcium, Teneur en caséines) et la dimension des micelles (**Jeantet et al., 2017**).

## **5. Présure**

La dénomination « présure » est donnée à l'extrait coagulant provenant de caillettes de jeunes ruminants (Bovins) abattus avant sevrage. De nos jours on l'utilise toujours en technologie fromagère, principalement sous forme liquide ou en poudre.

La présure est constituée en majorité de chymosine, de pepsine et de trypsine en moindre quantité (**Berridge, 1955**) sécrétées dans le quatrième estomac des ruminants non sevrés. Ces enzymes font partie de la famille des protéinases aspartiques car elles possèdent deux résidus caractéristiques dans leur site actif. Chez l'animal, ces protéinases sont sécrétées sous la forme de précurseurs, la prochymosine et le pepsinogène, dans le mucus stomacal pour but de digérer le lait maternel.

Les précurseurs sont appelés zymogènes et possèdent une région N-terminale qui va se loger dans leur site actif, les zymogènes sont ainsi auto-inactivés. Après leur sécrétion, les précurseurs sont activés suite à la perte d'une partie de leur région N-terminale. Cette réaction d'activation est effectuée par les conditions acides rencontrées dans l'estomac suite à différents changements conformationnels ainsi que des clivages inter et intra moléculaires (**Kurutahalli et al., 2010 ; Esposito et al., 2016**). La présure est constituée de deux enzymes bien distinctes la Chymosine et la Pepsine.

### **5.1. Succédanés de la présure**

Les recherches en vue de trouver des succédanés de la présure, ont commencé il y a une cinquantaine d'années, essentiellement en Inde et en Israël à cause du refus des végétariens de consommer du fromage à base de présure animale. Dans le monde musulman, l'utilisation de présure porcine est hors de question, ce qui constitue une autre bonne raison pour trouver des produits de substitution convenables. Ces dernières années, l'intérêt pour ces produits s'est généralisé, à cause de la pénurie de présure animale de bonne qualité (**Gosta, 1995**).

Selon **Ramet (1997)**, pour un succédané, plusieurs propriétés technologiques sont indispensables et doivent permettre de respecter les modalités habituelles des phases de la fabrication fromagère ; elles peuvent se résumer comme suit :

- L'activité coagulante doit être bonne dans les conditions physico-chimiques des laits habituellement transformés en fromagerie (pH, température, teneur en calcium).
- Les propriétés rhéologiques des coagulums doivent évoluer après la floculation, de façon à permettre le travail mécanique du gel dans les délais habituels.

- La synérèse du coagulum au cours de la phase d'égouttage doit permettre d'obtenir un fromage d'extrait sec et de composition chimique caractéristiques du fromage désiré, dans un délai au plus égal à celui observé avec la présure.
- Les modalités de l'affinage doivent permettre d'obtenir un produit fini présentant les normes organoleptiques habituelles après une durée de maturation voisine de celle des fromages fabriqués avec la présure.
- Les rendements en fromage, exprimés en extrait sec de fromage, doivent être au moins égaux à ceux relevés lors de l'emploi de la présure

### **5.1.1. Succédanés d'origine animale**

Différentes protéases digestives autres que celles contenues dans la présure telles la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine ont fait l'objet d'expérimentations (**Temiz et al., 2007 ; Temiz et al., 2008**), les deux premières entraînent des modifications profondes des modalités de fabrication et de la qualité des produits finis consécutives à la forme activité protéolytique. Ces enzymes ne sont pas utilisées au plan industriel, seules les pepsines porcines et bovines présentent un intérêt industriel.

Mélangé à la présure, la pepsine porcine apparaît être d'une utilisation plus large pour la fabrication des fromages acides. Tandis que pour la pepsine bovine, qui est un des constituants mineurs normaux de la présure mais dont la sécrétion devient prépondérante après sevrage, elle apparaît très voisine de la présure et son activité est moins dépendante du pH que celle de la pepsine porcine.

Selon **Morsli (1996)**, l'extrait du proventricule de poulet *Gallus Gallus* a permis la fabrication de Camembert dont la qualité organoleptique ainsi que le rendement fromager étaient comparables à ceux préparés avec la présure. La paroi interne de l'estomac de la morue de l'atlantique secrète une pepsine qui permet de coaguler le lait à 15°C plus efficacement que la chymosine de veau (**Haard et al., 1982**). D'où la possibilité, de contrôler l'activité protéolytique excessive par inactivation thermique. Enfin, une pepsine a été isolée de la muqueuse gastrique de phoque, au Canada, et donne de bons résultats dans la fabrication de Cheddar (**Polaina et Macabe, 2007**).



### **5.1.2. Succédanés d'origine végétale**

Des travaux très récents menés sur des substrats de plantes ont été publiés montrant le nouvel intérêt que suscite les protéases d'origine végétale (**Petropoulos et al., 2019**). Il existe plusieurs préparations coagulantes issues de règne végétale et sont extraite par macération de différentes parties de plantes supérieures. La coagulation du lait peut venir des pratiques que l'on retrouve dans le monde entier, par l'emploi, non pas d'acide lactique ou d'enzymes animales, mais d'extraits végétaux. De très nombreuse préparation coagulante sont issues du règne végétal.

L'Espagne et le Portugal ont la plus grande production de variété de fromages en utilisant l'extrait de *Cynara* (feuilles d'artichaut) comme agent coagulant. Ces extraits sont utilisé dans la fabrication des fromages portugais Serra et Serpa et l'Espagnol de Los Pedroches. Dans les régions chaudes plusieurs plantes renferment des principes coagulants telle que la ficine provenant du latex du figuier, la papaïne issue de papayer et la bromelaine issu du l'ananas. Toutefois, la nature protéolytique excessive de la plupart des coagulants végétaux a limitée leur utilisation dans la fabrication des fromages en raison de rendement fromagère réduit et des défauts de saveur et de texture (**Shah et al., 2014**).

### **5.1.3. Succédanés d'origine microbienne**

Plusieurs protéases d'origine microbienne ont été utilisées dans la fabrication du fromage car ils ont le même fonctionnement que celle de la chymosine. Elles sont produites par fermentation. Elles présentent des inconvénients telle qu'une grande activité protéolytique, un rendement faible dans la fabrication fromagère (**Harboe et al., 2010**).

Des études comparatives de ces enzymes coagulantes et de la chymosine ont indiqué de grandes similarités dans le mécanisme de la coagulation du lait et plusieurs variétés de fromages préparées avec ces extraits sont semblables à ceux obtenus avec la présure traditionnelle. Dans le souci d'améliorer les rendements de production et la réduction de l'activité protéolytique qui affecte la qualité des fromages, des études récentes font toujours l'objet de travaux sur la recherche de nouvelles sources microbiennes (**Cavalcanti et al., 2004 ; Alam et al., 2005 ; Esawy et al., 2006 ; Chwen-Jen et al., 2009**).



*Matériels*

*Et*

*Méthodes*

## 1. Matériel végétal

Afin d'atteindre le but de cette étude, cinq succédanés de la présure, appartenant au règne animale et végétale, ont été sélectionnés, le choix des succédanés a été fait en tenant compte des données bibliographiques, Pour le choix des succédanés de la présure d'origine végétale, une plante a été sélectionnée, à savoir, la camomille.

La camomille est une plante médicinale utilisée depuis l'Antiquité, appelée simplement « camomille » on distingue La camomille sauvage, matricaire camomille, petite camomille (*Matricaria chamomilla*) est une plante herbacée annuelle de la famille des Astéracées et du genre *Matricaria*. Elle est parfois appelée camomille allemande, camomille vraie ou matricaire tronquée.

La récolte a été faite en mois d'avril 2022 à Akbou. Les parties récupérées pour la camomille sont les fleurs, les feuilles et les tiges. Le choix de ces parties, dépend de la localisation de l'enzyme recherché.

L'échantillon représentatif de la camomille plante (feuilles, fleurs et tiges) récoltés subissent un séchage (**Figure 4**) à l'étuve à la température de 40 °C, au niveau de laboratoire de Soummam, jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

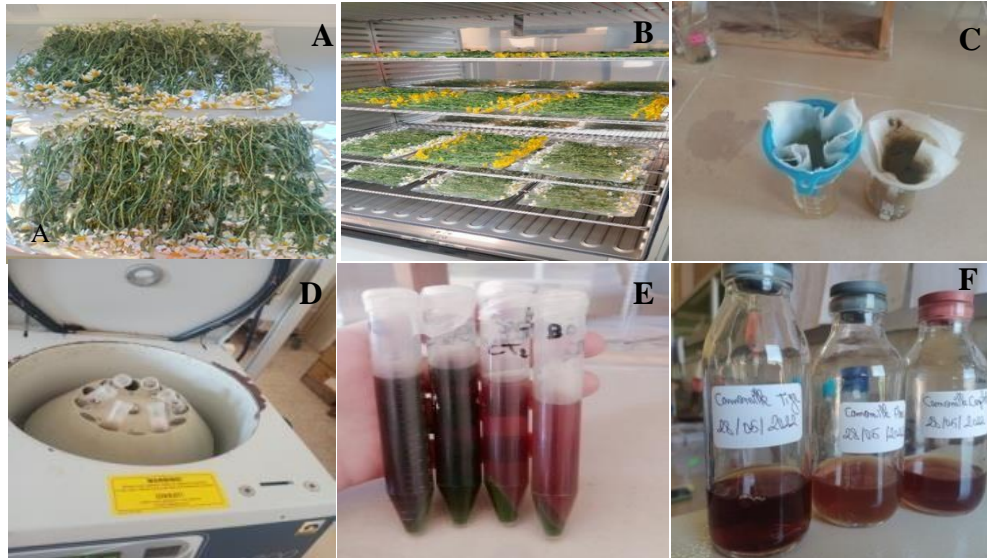
Une fois séchées (les feuilles, fleurs et tiges) subissent un broyage à l'aide d'un broyeur électrique plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une poudre. Les particules ainsi obtenues sont tamisées en utilisant des tamis de diamètre de 250 µm pour l'obtention d'une poudre homogène. Les poudres de feuilles, fleurs et tiges ainsi obtenues, sont entreposées dans des récipients en verre opaques et scellés hermétiquement, puis stockées à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à l'extraction.

### 1.1. Extraction de la camomille

L'extraction est effectuée selon le protocole décrit par **Sousa et Malacata (2002)**.

Une quantité de poudre (1.5g) est solubilisée dans un volume (30ml) de tampon phosphate (0.05M, pH 5.5). Une fois bien agité pendant 30minutes, l'ensemble est laissé au réfrigérateur pendant 12heures. Cette solution ainsi obtenu est filtrée, centrifugé à 1500g pendant 20 minutes,

et le surnageant qui représente l'extrait brut est alors récupéré pour être reparti dans des Eppendorfs (2ml) qui seront conservés au réfrigérateur.



**Figure 04** : Photographie des différentes étapes nécessaires pour l'obtention de l'extrait enzymatique.

**A** : Récolte de la camomille, **B** : Séchage dans l'étuve, **C** : Broyage et filtration de la poudre du camomille, **D** : Centrifugation du filtrat, **E** : Récupération du surnageant, **F** : Mettre le surnageant dans des flacons en verre.

## 2. Matériel animal

### 2.1. Proventricules de poulet

Les poulets ont un système digestif très simple, un simple estomac avec un sac dans l'œsophage utilisé comme un lieu de stockage pour la nourriture (**Figure 05**). Ils ont pas de dents et dépendaient des enzymes dans leur système digestif pour décomposer les aliments en petites particules qui peuvent être absorbés ; la nourriture qui ne peut être décomposé par ces enzymes est donc impropre aux poulets (**Aouissi et Brinet, 2016**).

L'estomac glandulaire est le véritable estomac du poulet ; il est aussi appelé proventricule qui ressemble à une bulle à la fin de l'œsophage où l'acide chlorhydrique (HCL) et la pepsine sont sécrétés. L'acide chlorhydrique aide à décomposer les glucides et l'amidon, alors que la pepsine décompose les protéines en acides aminés (**Aouissi et Brinet, 2016**).

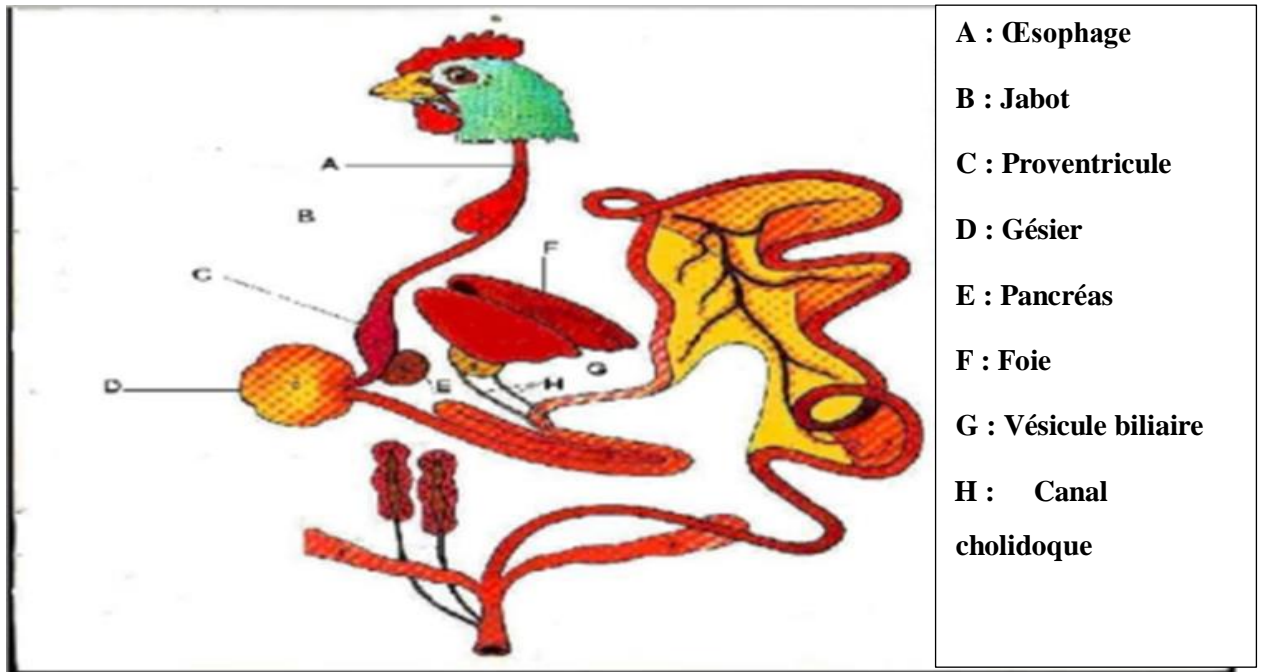
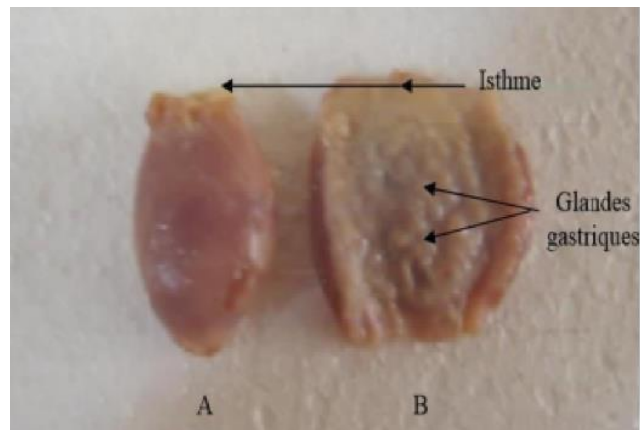


Figure 05 : Schéma représentatif de l'appareil digestif du poulet (Alamareot, 1982).

## 2.2. Préparation des proventricules

Les pro-ventricules (**Figure 06**) sont récupérés d'une boucherie située dans la région de Bejaia. Après abattage et éviscération des poulets, les proventricules sont séparés du tube digestif de poulet, débarrassé de la matière grasse qui l'entoure puis lavé. Ces pro-ventricules de poids variant entre 8 et 10 g sont réfrigérés et acheminés vers le laboratoire de technologie alimentaire de la faculté des sciences de la nature et de la vie, où ils sont immédiatement ouverts par incision longitudinale et vidés de particules alimentaires adhérentes aux parois et rincés à l'eau courante pour éliminer les particules d'aliments adhérentes, ils sont repartis en lot de 100g environ, puis égouttés jusqu'à utilisation.



**Figure 06** : Photographie des pro-ventricules de poulet.

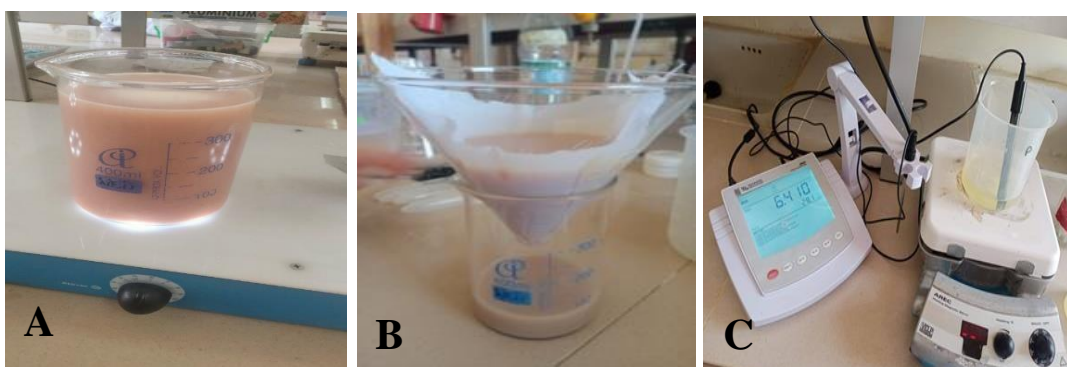
**A** : Avant incision

**B** : Après incision.

### 2.3. Extraction de la pepsine

L'extraction de système enzymatique de pro-ventricules de poulet est obtenue selon le protocole décrit par **Bohak, (1970)** légèrement modifié par **Nouani et al., (2011)**. Les proventricules récupérés, sont découpés et bien hachés à l'aide d'un hachoir (Moulinex), puis elles sont mélangées avec une solution saline de macération (3g/l de NaCl et 0,7 g/l de NaHCO<sub>3</sub>), à raison de 300 ml de la solution de macération pour 100 g des pro-ventricules.

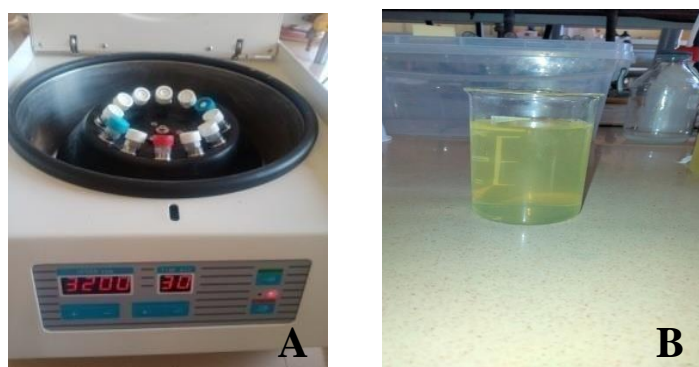
Le pepsinogène contenu dans l'extrait brut (filtrat) est converti en enzyme actif (Pepsine) en abaissant le pH jusqu'à 2,0 à l'aide d'une solution d'HCl 3N, le mélange est maintenu pendant 30 min à température ambiante.



**Figure 07** : schéma représentatif des opérations d'extraction de l'extrait brut de pro-ventricule. **A** : Agitation du mélange, **B** : Filtration, **C** : Mesure du pH du filtrat

Un autre de l'objectif d'activer le pepsinogène, cette opération provoque, la floculation du mucilage ; ce qui facilite par la suite, la clarification. Après activation, un ajustement du pH à 6,4 est réalisé par l'addition d'une solution de NaOH 1N (**Figure 07**) (**Addoui, 2014**).

Finalement centrifugé à une force centrifuge de 3200g pendant 30 min dans une centrifugeuse permettant l'élimination du mucilage (**Figure 08**). Le surnageant obtenu, représentant l'extrait d'enzyme clarifié est récupéré et conservé au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation, alors que le culot qui représente le mucilage et les débris des tissus est éliminé.



**Figure 08** : Schéma représentatif des opérations de clarification de l'extrait brut

De pro-ventricule.

**A** : Centrifugation, **B** : Extrait de proventricule

### **3. Préparation de l'extrait enzymatique de présure**

L'extrait enzymatique de présure utilisé dans la présente étude, est préparé à partir d'une poudre d'enzyme lyophilisée (100% chymosine). Cette poudre est utilisée dans la laiterie SOUMMAM pour la fabrication du fromage, en additionnant 5.25g présure à 40 ml d'eau distillée stérile. Pour activer cette préparation enzymatique, 5g de NaCl sont ajoutés.

### **4. Teneur en protéine**

Le dosage des protéines totales d'extrait enzymatique a été déterminé selon la méthode de (**Bradford 1976**), La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique dont le principe repose sur l'absorption du bleu de Coomassie G-250 sur les protéines (avec les acides aminés basiques tel que : Arg, Lys, His).

Une fois lié aux protéines sa couleur vire vers le bleu avec une absorbance maximale aux alentours de 595 nm, dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon.

$$MS (\%) = P \times 100 / P_i$$

$$H (\%) = 100 - MS (\%)$$

Pour 1ml de l'extrait enzymatique de poulet dilué avec 19 ml de l'eau distillée, prendre 0.5 ml de ce mélange + 2ml de réactif de Bradford sont ajoutés. Pour 0.5 de l'extrait enzymatique de la camomille + 2ml de de réactif de Bradford sont ajoutés.

Une fois bien homogénéisé avec un vortex, l'ensemble est gardé à l'obscurité et à température ambiante pendant 20 minutes, et l'absorbance est alors mesurée au spectrophotomètre à 595nm. La concentration en protéines, des extraits enzymatiques, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage avec la protéine du sérum albumine bovine (SAB) réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons (**Annexe I**).

## **5. Mesure de l'activité enzymatique**

L'activité enzymatique de l'extrait brut de la camomille et la pepsine de poulet, a été estimée par deux méthodes, à savoir la mesure de l'activité protéolytique et l'évaluation de l'activité coagulante.

### **5.1. Evaluation de l'activité coagulante**

#### **5.1.1. Mesure du temps de floculation**

L'activité coagulante s'exprime par la rapidité avec laquelle l'enzyme coagule le lait ; elle est déterminée par mesure du temps de floculation selon la méthode de Berridge (**Siar, 2014**). Le temps de floculation est l'intervalle de temps compris entre l'addition de l'extrait enzymatique (l'emprésurage) et l'apparition des premiers fins flocons de caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne du tube à essai. (**Gordin et Rosenthal, 1978**).

#### **5.1.2. Activité coagulante**



Le pouvoir coagulant des protéases est déterminé par mesure de l'activité coagulante.

Cette activité s'exprime par la rapidité avec laquelle l'enzyme employé coagule le lait. L'activité coagulante est testée sur le lait reconstitué comme substrats par mesure du temps de floculation à 35 °C selon la méthode de Berridge, (1955).

L'unité d'activité coagulante (U.A.C.) ou unité présure (U.P.) est définie comme étant la quantité d'enzyme contenue dans 0.5ml de la solution enzymatique qui provoque la floculation de 5 ml de substrat à 35 °C (Allais, 1984) et elle est calculée comme :

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

Où

**V** : Volume du substrat en ml ;

**T** : temps de floculation en secondes ;

**V'** : volume de la solution enzymatique en ml ;

Le procédé consiste à ajouter 0.5 ml d'extrait enzymatique à un volume de 5 ml du lait dans un tube à essai porté à 35 °C dans un bain Marie puis noter le temps de floculation. Le tube immergé est maintenu incliné, de telle sorte que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du substrat de berridge. Le substrat forme un film mince et homogène. Au moment de la floculation, des petits flocons apparaissent au sein de ce film.

## **5.2. Evaluation de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode décrite par (Green et stackpoole 1975), basée sur l'estimation de la quantité des peptides simples et des acides aminés libres formés par l'hydrolyse d'une protéine substrat sous l'action d'une protéase ou un mélange de protéases.

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

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



1951), en utilisant la caséine comme substrat dans les conditions adaptées (Mechakra, Auberger et al. 1999).

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

Le mélange réactionnel consiste à mélanger 1g de caséine dans 50 ml de tampon phosphate (0.1M, pH 7).

Un volume de 1ml de ce mélange est additionné de 1 ml d'extrait enzymatique, qui sera ensuite bien agité et incubé au bain marie à la température de 35°C pendant 20 minutes, et la réaction est arrêtée par l'addition de 5 ml de TCA à 5% et laissé au repos pendant 15 minutes à température ambiante.

L'ensemble est alors centrifugé, et 0.5 ml de surnageant est additionné de 2,5 ml de la solution C préparée en mélangeant un volume de 10 ml de la solution A avec un volume de 200 µl de la solution B.

La solution A est préparée en mélangeant 0.2 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 1 g de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) dans 50 ml d'eau distillée.

La solution B est préparée en mélangeant 0.1 g de tartrate sodium-potassium (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>) et 50 mg de sulfate de cuivre CuSO<sub>4</sub> dans 10 ml d'eau distillée.

Après une incubation pendant 10 minutes à 35 °C, un volume de 250µL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au 1/2) est ajouté.

Une fois bien agité et incubé à température de 35°C pendant 20 min, 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 II**).

L'activité protéolytique, exprimée en µg/ml.min, correspond à la libération de 1µg de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par minute et dans 1mL de substrat. A partir de l'activité protéolytique, une activité spécifique, exprimée en µg/mg. min, est calculée. Elle est définie comme étant le rapport entre l'activité enzymatique et la teneur en protéines de l'extrait enzymatique.

**Activité spécifique** = activité enzymatique (µg /ml.min) / teneur en protéines (mg/ml)

## 6. Force coagulante

L'activité coagulante peut être également exprimée en force coagulante de Soxhlet. Cette force coagulante définit le volume du lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique ou d'une enzyme, en 40 minutes, à 45 °C et pH 6,4 du substrat (lait) (**Benyahia, 2013**). La force coagulante est exprimée par la formule suivante :

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

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

**V** : Volume du lait ajusté (pH : 6,4, T° :45°C) ;

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

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

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

## 7. 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., 2015**).

### 7.1. 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 35°C à 70°C avec un pas de 5°C.

### 7.2. Influence du pH du lait

L'influence de pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait pepsique, camomille et de la présure étudié a été déterminée en faisant varier le pH du lait de 5,5 à 8 avec un intervalle de 5.

**7.3. Détermination de la concentration optimale du CaCl<sub>2</sub>**

La concentration optimale en CaCl<sub>2</sub> de la coagulation du lait a été déterminée en faisant varier la concentration du lait en ions CaCl<sub>2</sub> de 0,005 M à 0,04M.

**7.4. Influence de la concentration en extrait enzymatique**

L'effet de la concentration des extraits enzymatiques étudiés a été déterminé en faisant varier leurs concentrations de volume enzymatique de 0.25ml à 1.5 ml.

*Résultats*  
*Et*  
*Discussion*

## I. Caractéristiques physico-chimiques des extraits enzymatiques

Les résultats de l'étude des caractéristiques physico-chimiques et activité enzymatique des extraits enzymatiques brut camomille présure poulet, sont représentés dans le tableau suivant.

**Tableau II :** Caractéristiques physico-chimiques de extraits enzymatiques étudiés.

Caractéristiques	présure	Poulet	camomille
<b>pH</b>	4.6	6.6	4.55
<b>Couleur</b>	transparent	Jaune claire	Marron foncé
<b>Texture</b>	liquide	liquide	liquide
<b>Rendement (%)</b>	100%	73.33%	80%
<b>Teneur en protéines (µg/ml)</b>	160.16	1065.58	207.34
<b>Activité protéolytique (µg/ml/min)</b>	14.83	4.44	1.83
<b>Activité enzymatique spécifique (µg/µg.min)</b>	0.0925	0.0041	0.0088
<b>Activité coagulante UP</b>	32.84	65.32	3.12
<b>Force coagulante</b>	333.33	168.66	/

### 1. Caractérisation de l'activité enzymatique des extraits

#### 1.1. Rendement de l'extraction

L'extrait clarifié de pepsine obtenu est une solution liquide de couleur jaunâtre. Le rendement d'extraction est d'environ 73.33 %. Le volume obtenu est d'environ 220 ml d'extrait enzymatique clarifié.

L'extrait de la camomille obtenu est une solution visqueuse de couleur marron claire. Le rendement est d'environ 80%. Le volume finale est de 24ml d'extrait enzymatique.

### **1.2. Potentiel d'hydrogène des extraits enzymatiques**

La mesure du potentiel d'hydrogène (pH) et son ajustement est nécessaire pour renseigner sur l'état de l'efficacité des enzymes, elle est réalisée avant chaque analyse.

Dans le cas du changement de pH, on doit le régler avec les solutions d'ajustement (HCl, NaOH). Le pH de la pepsine de poulet activée est de 6,6 alors que cela de la camomille 4,55 et la présure 4,6.

### **1.3. Force coagulante**

Les résultats obtenus ont montré que la force coagulante de la présure (333.33) est 2 fois plus élevée que celle de la pepsine (168.66).



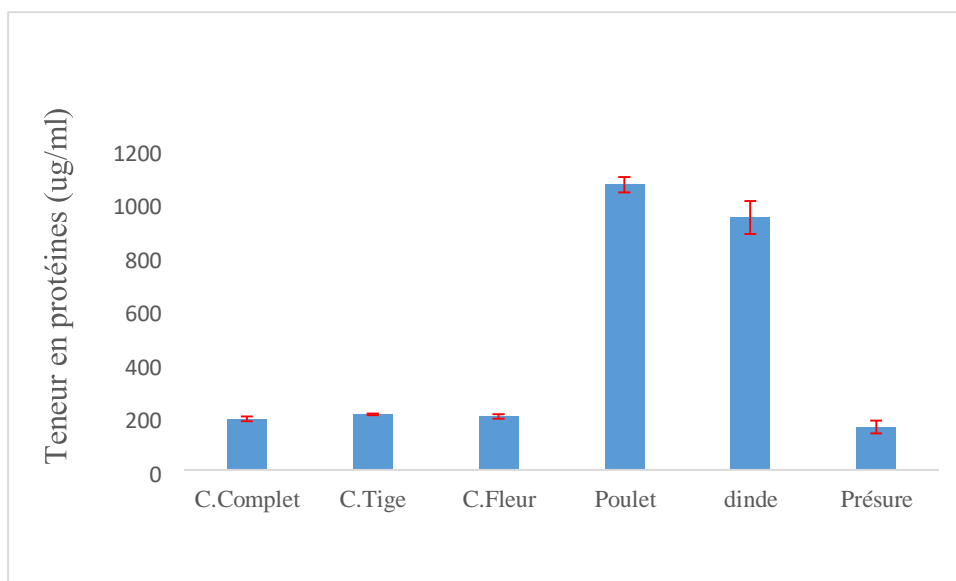
**Figure 09** : Photographie du résultat obtenu de l'estimation de la force coagulante.

### **1.4. Dosage des protéines des extraits enzymatiques**

Selon la méthode de Bradford, en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec la BSA (sérum albumine bovine) dans les mêmes conditions expérimentales.

Les résultats obtenus (**Figure 10**) ont montré que la teneur en protéines des extraits de poulet, dinde et camomille est très élevée par rapport à celle de la présure. En effet, elles sont

d'environ de 1065,58  $\mu\text{g/ml}$  pour l'extrait de poulet et 943,08  $\mu\text{g/ml}$  pour l'extrait de la dinde, et pour l'extraits de camomille 207,34  $\mu\text{g/ml}$  contre 160,16  $\mu\text{g/ml}$  pour la présure.



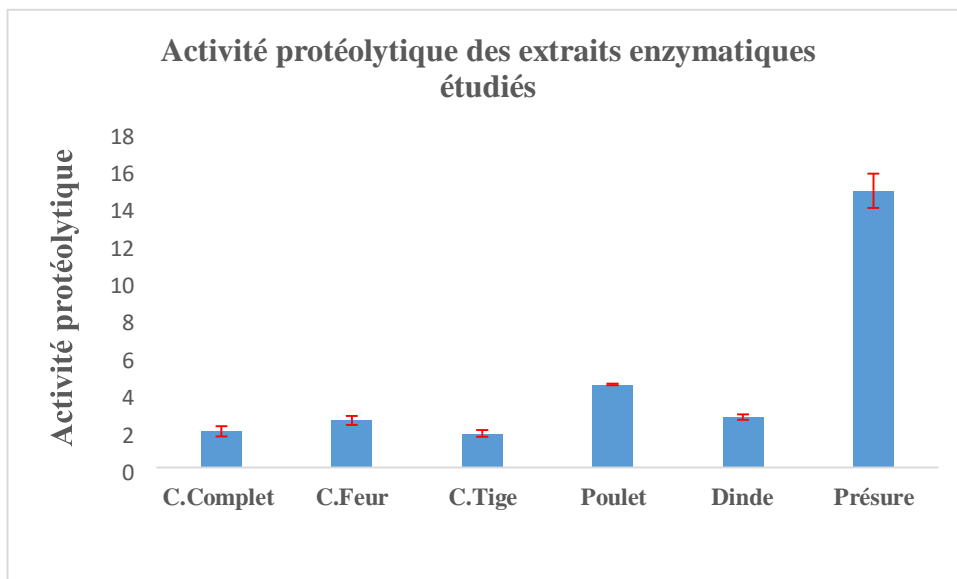
**Figure10** : Teneur en protéines des extraits enzymatiques étudiés.

Les barres verticales représentent les écarts types ( $n = 3$ )

Les résultats de la présente étude ont montré que les extraits animal (poulet 1065 $\mu\text{g/ml}$ , dinde 943 $\mu\text{g/ml}$ ) et végétal (camomille 207 $\mu\text{g/ml}$ ) étudiés ont une teneur en protéines plus élevée comparé à l'extrait industriel de la présure (chymosine) (Présure 160 $\mu\text{g/ml}$ ). Cette différence de la teneur en protéine est possible due à plusieurs facteurs entre autres le facteur variétal, la conduite agronomique, le climat et la saison (**Dash et al., 2016**).

### 1.5. Détermination de l'activité protéolytique

Toutes les enzymes coagulantes qu'elles soient d'origine animale, végétale ou microbienne, sont capables d'hydrolyser la caséine  $\kappa$ , provoquant ainsi la coagulation du lait. Toutefois cette condition est suffisante pour l'utilisation de ces enzymes en industrie fromagère (**Alais, 1984**), mais pour la production des fromages de qualité, il faut tenir pouvoir d'hydrolyser les caséines  $\alpha$  et  $\beta$  (**Lapointe-Vignola, 2002**). Les résultats de l'estimation de l'activité protéolytique des extraits étudiés sont représentés dans la figure 11.



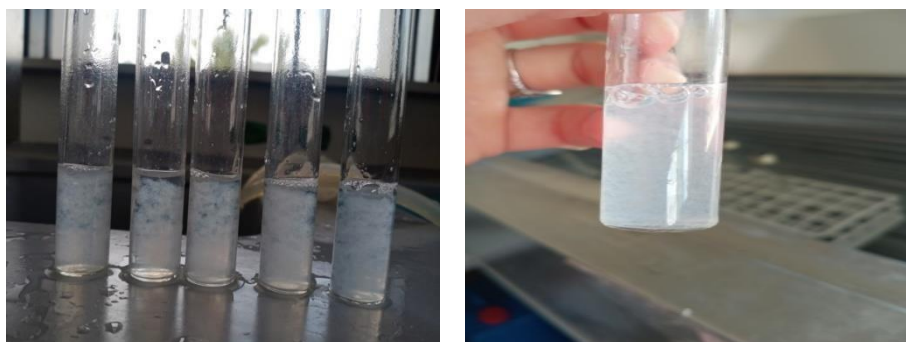
**Figure 11** : Résultats de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques étudiés

Les barres verticales représentent les écarts types (n = 3)

D'après les résultats obtenus (**Figure 11**), l'activité protéolytique, exprimée par le taux de Tyrosine libéré, des extraits bruts à l'ordre de poulet, camomille et présure est de valeur 4.44 µg/ml.min, 1.83 µg/ml.min, 14.83 µg/ml.min. Ces résultats indiquent que l'extrait de présure possède une activité enzymatique très élevée par rapport à celle de pepsine et camomille (**Boucherine et Ouchene, 2017**).

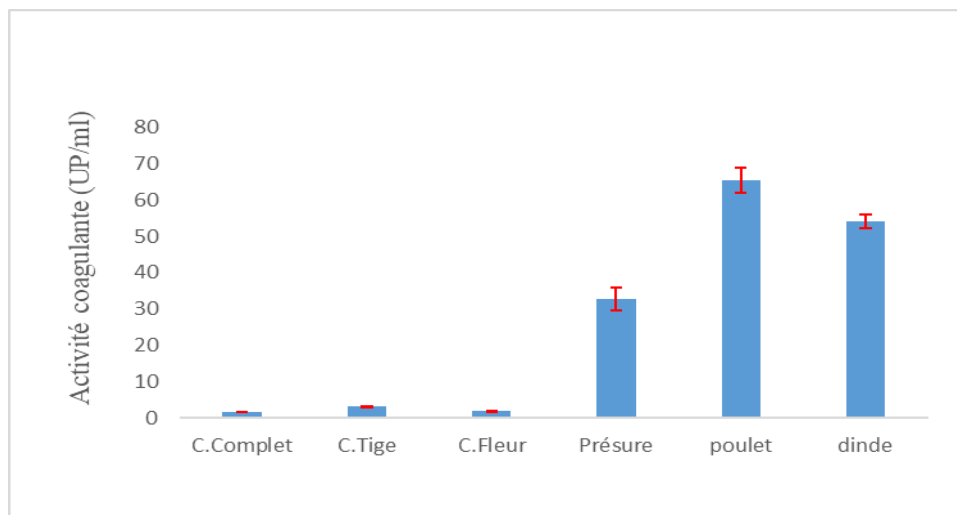
### 1.6. Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante des extraits de pepsine de poulet, la présure et de la camomille pour faire la comparaison entre eux.



**Figure 12** : Photographie représente l'activité coagulante des extraits.





**Figure 13** : Résultats d'estimation de l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

Les barres verticales représentent les écarts types (n = 3)

Les résultats ont montré que l'activité coagulante de l'extrait de poulet et la dinde est très élevée et elle est 2 fois plus élevée que celle de la présure. En effet, nous avons obtenu des valeurs de 65.32 UP pour l'extrait de poulet et 54.04 UP pour l'extrait de la dinde contre 32.84 UP pour la présure. Mais pour l'extrait végétal camomille l'activité coagulante est moins élevée 10 fois que celle de la présure. Ou, nous avons obtenu une valeur de 3.12 UP pour la camomille contre 32.84 UP pour la présure. Donc, l'extrait animal (pepsine) a une activité coagulante plus élevée comparé à l'extrait présure (chymosine) (**Figure 13**).

## 2. Détermination des conditions optimales de coagulation

Plusieurs facteurs influent sur la coagulation tels que la concentration en enzymes, le pH du substrat de berridge, la température, la teneur en  $\text{CaCl}_2$ , extrait enzymatique (**Jeant et al., 2008**).

Dans le but de déterminer les conditions physicochimiques optimales pour l'action de l'extrait de pepsine et de camomille, nous avons essayé de voir l'influence de certains paramètres sur leur activité coagulante par comparaison entre eux.

### 2.1. Effet du pH

Le pH influence le fonctionnement des enzymes. De ce fait, il existe un pH optimal, autour duquel l'enzyme fonctionnera le mieux et sera plus efficace. Ce pH optimal, propre à

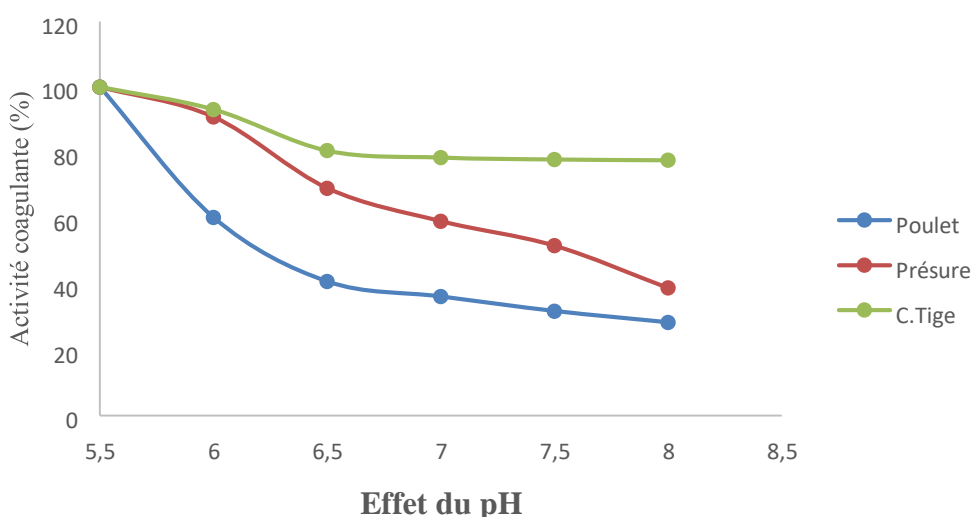
chaque enzyme, se situe généralement pour la plupart des enzymes aux alentours de 7 (pH neutre). Plus on s'éloigne de cette valeur, plus l'enzyme est dénaturée.

En effet, l'acidité du milieu peut déformer la structure tertiaire d'une enzyme de façon plus ou moins importante. Cette déformation de l'enzyme modifie son action, et ne fonctionne plus normalement et sa vitesse catalytique est réduite (**Robitaille et al., 2012**).

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

L'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait de pepsine et de camomille a été étudié en ajustant le pH du substrat de berridge aux valeurs de l'intervalle 5,5 à 8, La température d'incubation est fixée à 35 °C.

Le pH optimal de coagulation déterminé par observation du temps de floculation le plus court. Les résultats présentés par les courbes suivantes indiquent une diminution de l'activité coagulante des trois préparations enzymatiques au fur et à mesure que le pH du lait augmente.



**Figure 14** : Variation de l'activité coagulante des extraits en fonction du potentiel d'hydrogène (pH).

Les résultats obtenus montrent, que l'activité coagulante des trois extraits brut (présure, poulet, camomille) diminuent progressivement avec l'augmentation du pH.

A pH 5.5, les extraits bruts atteignent le 100%, à pH 6 elle est de l'ordre de 90%, 60%, 95%. Les trois extraits bruts sont plus actifs dans le domaine acide, que dans le domaine neutre, ce qui est en accord avec les travaux de (Abhiraman Kumar *et al.*, 2020), qui ont rapporté que l'enzyme est instable à pH neutre et plus stable à pH acide. Des résultats similaires ont été déjà rapportés par (Murlidhar *et al.*, 2017), montrent que les différentes formes des extraits sont plus actives au gamme de pH acide (Figure 14).

## 2.2. Effet de température

Chaque enzyme possède une température optimale spécifique. Plus cette température baisse, plus le mouvement moléculaire sera réduit et plus la cinétique enzymatique sera lente et l'enzyme devient inactive (Robitaille *et al.*, 2012).

L'effet de la température de substrat de berridge sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés est déterminé par la mesure de l'activité coagulante à différentes températures d'incubation avec un intervalle de 5 °C allant de 35 à 70 °C. La figure 15 montre l'évolution de l'activité coagulante des extraits étudiés par comparaison entre eux en fonction de la température de substrat de berridge.

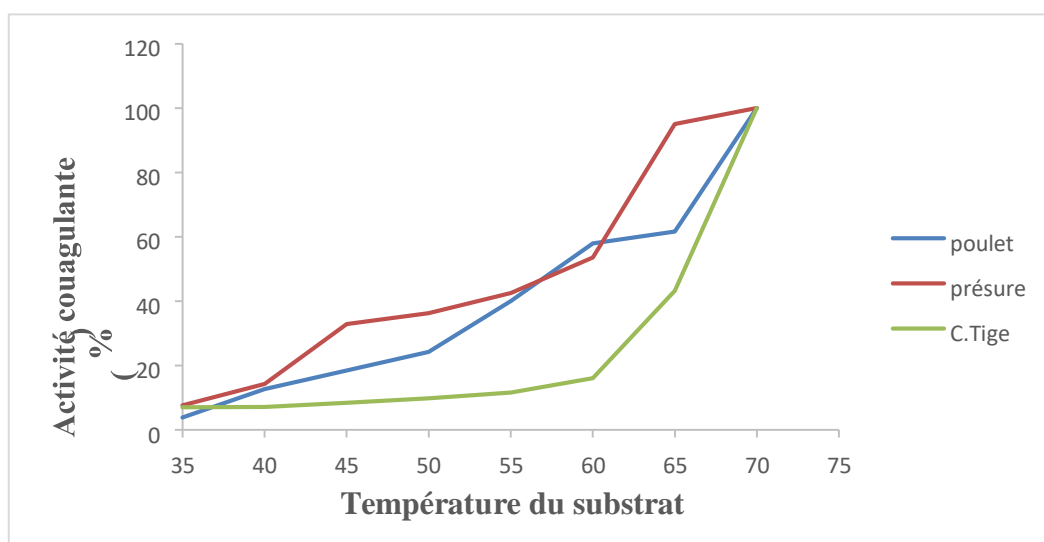


Figure 15 : Effet de la température du substrat sur l'activité coagulante.

Les résultats de la présente étude, montrent l'existence d'une différence de comportement entre les trois extraits enzymatiques suivant les températures étudiées.

L'optimum d'activité coagulante pour les extraits (présure, poulet, camomille) est obtenu à une température de substrat de berridge égale à 70 °C (100%) avec des valeurs de 952.38 UP, 1809.52 UP, 28.57UP. Ces résultats sont proches de ceux retrouvés par **Payne (2009)**, qui est de 70 °C.

Ce résultat est très similaire à celui rapporté par **Devaraj et al., (2008)**, qui ont rapporté une activité enzymatique maximal végétales à l'intervalle de températures comprises entre 60 et 70°C.

En effet, lorsque la température du milieu augmente, les particules (molécules ou ions) sont plus agitées, ce qui favorise la rencontre des différents réactifs. Les molécules s'entrechoquent et libèrent de l'énergie, qui permet ensuite d'atteindre plus rapidement le palier de l'énergie d'activation nécessaire à la réaction. Dans ce cas, l'augmentation de la température a un effet positif sur la réaction, mais après une certaine activité thermique, elle diminue en raison de la dénaturation (**Bayraktar and Önal, 2013 ; Kumar et al., 2012 ; Özer et al., 2010**) et selon (**Nouani et al.,2011**) la température optimale pour la coagulation du lait par la présure est au voisinage de 45 °C, pour un lait à pH=6.6. L'augmentation de la température du lait entraîne une amélioration très nette de l'activité coagulante des trois enzymes étudiés.

L'effet de la température résulte de la conjugaison de deux effets, l'un sur la réaction enzymatique, l'autre sur la phase secondaire de la coagulation et qui correspond à l'étape d'agrégation.

En effet, la coagulation du lait ne peut avoir lieu qu'à des températures supérieures ou égales à 35 °C. Cela est due à l'importance des interactions hydrophobes dans l'agrégation des micelles hydrolysées (**Grzonka et al., 2007 ; Feijoo-Siota et al.,2011 ; bekhi et al., 2013**).

Le processus de l'inactivation de l'enzyme à des taux extrêmement élevés de température s'étale sur deux étapes, d'abord par l'ouverture partielle des structures ; secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme qui sont dues à la rupture des liaisons covalente et des liaisons

hydrophobes. Plus loin la structure primaire de l'enzyme change car certains acides aminés sont endommagés par le chauffage (Masfufatun, 2009).

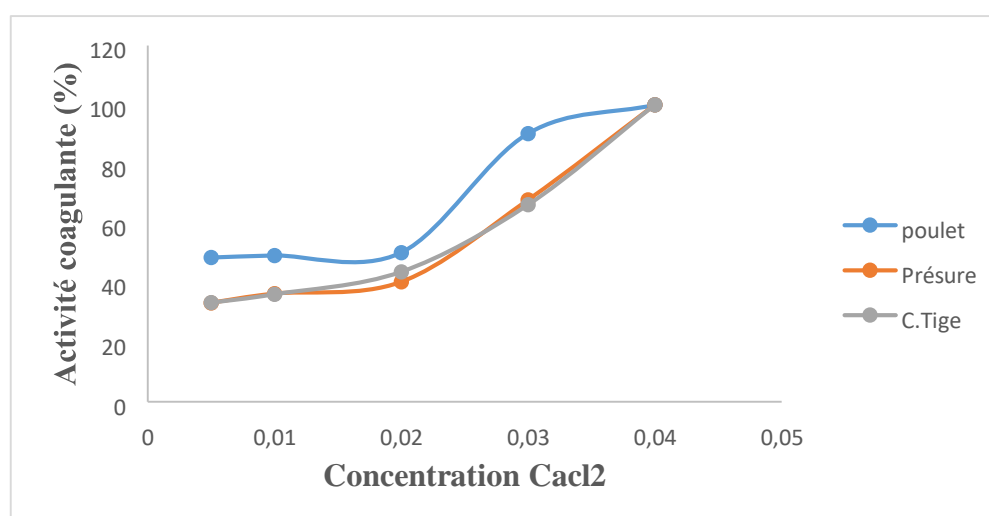
### 2.3. Effet de la concentration en chlorure de calcium sur l'activité des extraits étudiés

La réticulation du gel lors de la coagulation du lait par la présure, impliquant des liaisons phosphocalciques, est particulièrement influencée par la teneur et la nature du calcium présent. L'addition du  $\text{CaCl}_2$  entraîne une augmentation du calcium ionisé et du calcium colloïdal ayant pour conséquence un temps de coagulation plus court et une fermeté du gel plus élevée (Kellil, 2015)

L'addition du chlorure de calcium au substrat de berridge, se traduit par l'augmentation du taux d'agrégation des protéines (Jeantet et al., 2008).

L'effet de la concentration du  $\text{CaCl}_2$  sur l'activité coagulante des extraits brut de poulet, camomille et de la présure a été étudié en variant la concentration en  $\text{CaCl}_2$  (substrat de berridge) aux valeurs de 0,005 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 M pour les extraits bruts.

Les résultats obtenus par l'effet de la concentration de  $\text{CaCl}_2$ , sur l'activité coagulante des extraits de poulet, camomille et présure sont représentés dans la **figure 16**.



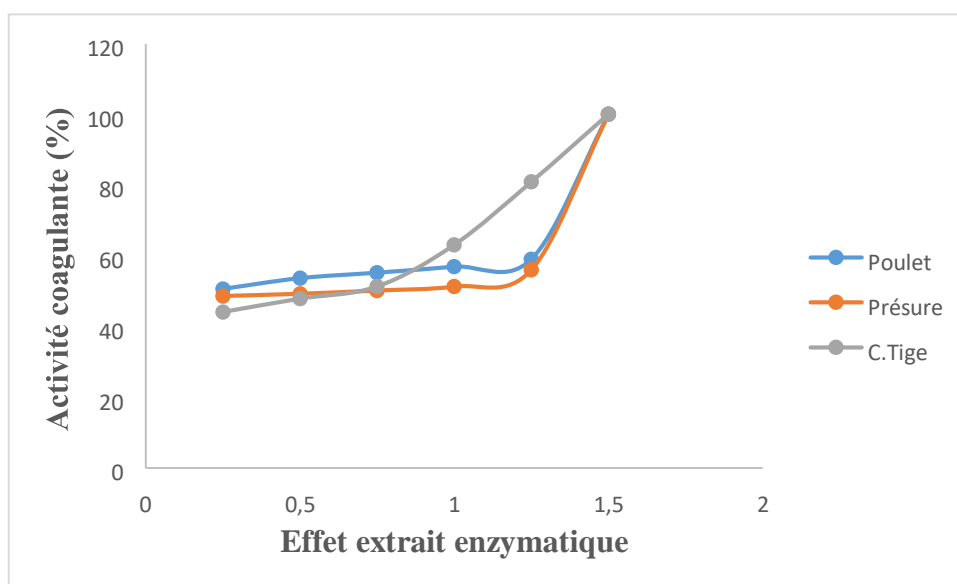
**Figure 16** : Effet de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  du substrat sur l'activité coagulante.

Les résultats obtenus dans la présente étude, montrent que l'activité coagulante des extraits étudiés augmente avec l'augmentation de la concentration du  $\text{CaCl}_2$ , dont l'activité, la plus élevée est observée à la concentration de 0,04M pour les extraits enzymatiques de poulet, de la camomille et de la présure. Ces résultats sont en accord avec les résultats retrouvés par **Nouani et al., (2011)**.

#### 2.4. Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante des extraits brut

La concentration en enzyme est inversement proportionnelle au temps de coagulation. Cependant, elle est proportionnelle à la vitesse d'hydrolyse de la caséine  $\kappa$  (phase enzymatique) et à la vitesse d'agrégation des micelles (phase physique) (**Boughellout, 2007**).

L'effet de cette concentration sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudié est déterminé par la mesure de l'activité coagulante à différentes concentrations de l'enzyme à savoir : 0.25ml, 0.5ml, 0.75ml, 1ml, 1.25ml, 1.5ml.



**Figure 17** : Effet de la concentration des extraits enzymatiques sur l'activité coagulante

Les résultats obtenus, de l'effet de la concentration de l'enzyme, sur l'activité coagulante des extraits brut de poulet, de la camomille et de la présure, sont représentés dans la **figure 17**.

Les résultats obtenus, montrent que la concentration de l'enzyme influence l'activité coagulante des extraits étudiés, et l'augmentation de la concentration de l'enzyme dans le milieu réactionnel entraîne une augmentation de l'activité coagulante des extraits enzymatiques de poulet, camomille et présure. L'activité coagulante la plus faible est enregistrée à la concentration de l'enzyme de l'ordre de 0.25ml, qui est estimée à 51% pour l'extrait de poulet 44% pour l'extrait de camomille 49% pour la présure.

Cette activité augmente avec une allure plus importante, pour les extraits bruts de poulet, de la camomille et de la présure pour les mêmes concentrations d'enzyme dans le milieu. Les résultats obtenus montrent l'augmentation de l'activité au fur et à mesure que la concentration de l'enzyme augmente, dont l'activité la plus élevée (100% enregistrée à 1.5/ml de l'enzyme).

Plus la concentration de l'enzyme augmente dans le milieu plus le temps de coagulation diminue. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Mahaut et al., (2003)**. Ce dernier a reporté que le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en enzyme.

# *Conclusion*



Notre travail est porté sur la contribution à la recherche des succédanés de présure utilisables industriellement. Nous avons étudié la possibilité de substituer la présure par l'extrait clarifié de la pepsine de poulet (d'origine animale) et l'extrait brut de la camomille (d'origine végétal)

Ce travail vise à étudier les caractéristiques des deux agents coagulants proposés. Notre démarche a comporté deux étapes. Premièrement, la récupération des matières premières renfermant les systèmes enzymatiques recherchés puis l'extraction des enzymes (pepsine de poulet et protéase de camomille), deuxièmement, la caractérisation des extraits de point de vue teneur en protéines, l'activité et force coagulante et l'activité protéolytique, et les conditions optimales d'activité coagulante (température, pH, concentration en  $\text{CaCl}_2$  et de la concentration de l'extrait enzymatique) L'extraction selon le digramme appliqué nous a permis d'avoir des extraits enzymatiques de camomille et de pepsine de poulet dont les caractéristiques sont respectivement les suivantes :

- La pepsine de poulet à une activité coagulante de 65.32 U. P, une force coagulante de 168.66 U. P pour la pepsine. Le rendement d'extraction est estimé à 74,33 %.
- La camomille a une activité coagulante de 3.12 U. P, et elle n'a pas une force coagulante peut-être à cause de la non purification et un rendement d'extraction de 80 %.
- Une activité protéolytique, exprimée en ( $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{min}$ ), de l'ordre de 1.83 pour la camomille, de 4.44 pour la pepsine de poulet.

Les résultats de l'étude de l'influence des paramètres physico-chimique du lait (la température, le pH, la concentration en  $\text{CaCl}_2$ ) et la concentration en extrait enzymatique sur ses activités coagulante et protéolytique ont révélé des résultats intéressants et promoteurs.

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

Matières assez disponibles et inexploitées.

Cependant il est intéressant de poursuivre ce travail par :

- L'étude des paramètres influençant l'extraction de ces deux enzymes afin d'améliorer la qualité des extraits et le rendement d'extraction ;
- La possibilité d'utilisation des extraits de la camomille et de la pepsine dans la fabrication de différents types de fromages ; de leur effet sur la qualité des fromages obtenus.
- L'application de méthodes plus performantes pour la purification des protéases végétales et de la pepsine animale afin d'envisager d'autres applications.

*Références*  
*Bibliographiques*

## Références bibliographiques

---

- **Abdellaoui R. (2007)** : Obtention et caractérisation d'une enzyme coagulant le lait d'*Aspergillus niger* isolé sur Sole de la région de Boumerdes. Mémoire de Magister, Université M'hamed Bougara, Boumerdes. p 3-7
- **Abhiraman Kumar, Soumya Sasmal., (2020)** : Rheological and physico-chemical properties of milk gel using isolate of pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds : A new source of milk clotting peptidase. Food Hydrocolloids
- **Adoui F. (2014)** : Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir de proventricules de poulet. Mémoire de Magister. Université Mentouri, Constantine. p10-15-64.
- **Alais C (1984)** : Science du lait : principes et techniques laitiers. Techniques et Documentation – Lavoisier, Paris, p814
- **Alais, C. Linden, G et Miclo. L** : Biochimie alimentaire. 6ème édition de l'abrégé. Masson, Paris : DUNOD. 2008, p 260.
- **Alait C., (2003)** : Abrégé en biochimie alimentaires. Paris, Dunod, p 250.
- **Alamareot J. (1982)** : Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaire, édition du point vétérinaire Alfort 1982, p 289.
- **Amiot J., Fournier S., Leboeuf Y., Paquin P. et Simpson R. (2002)** : Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait, In : Vignola C.L., 2002. Science et technologie du lait : Transformation du lait. Presse internationale polytechnique, Montréal (Canada), p600.
- **Aouissi L et Brinet H. (2016)** : Extraction de la pepsine à partir des proventricules de Volailles et aptitude à la coagulation du lait. Mémoire de master académique, Université 8 Mai 1945 Guelma. p 45.
- **Benyahia F. (2013)** : Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vue d'une valorisation des proventricules de volailles au profit de la filière lait en Algérie. Thèse de Doctorat, Université Constantine 1. P13-10.
- **Bergmeyer H.U., Gawekn K., et al., (1979)** : Principes de l'analyse enzymatique. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 17.
- **Berridge N.J. (1955)** : Purification and assay of rennin. Methods in enzymology. Ed. Perlmann G.E. and Lorand L., New York. Vol. 2. P69-77
- **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 Volume 19, p347-358, p1042.

□

- **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 de poulet. Mémoire de Magister, Université Mentouri, Constantine. P13.
- **Bradford M (1976) :** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*.p 72. 248-254.
- **Cavalcanti MTH., Martinez CR., Furtado VC., Neto BB., Teixeira MF., Lima Filho JL :** Characterization of a milk-clotting enzyme from (*Aspergillus oryzae*) MTCC 5341. *Applied Microbiology and Biotechnology*, p85, 1849–1859.
- **Chazarra, Soledad, Lara Sidrach, Dorotea López-Molina, et José Neptuno Rodríguez-López. (2007) :** « Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers ». *International Dairy Journal* 17 (12) : p1393-1400
- **Cheftel J., Cheftel H And Besancon P., (1996) :** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Coagulant le lait extrait à partir du proventricule de poulet (*gallus gallus*).
- **Collin, J.-C. (2015) :** Présures et coagulants de substitution : Comment faire le bon choix ? Editions Quae D'*aspergillus niger* isole su Sole de la région de boumerdes. Mémoire de Magister, Université M'hamed Bougara, Boumerdes.p 3-7.
- **Corredig M., Salvatore E., (2016) :** Enzymatic coagulation of milk. In P. L. H. McSweeney, & J. A. O'Mahony (Eds.). *Advanced dairy chemistry, volume 1B, proteins : Applied aspects*fourth edition (pp. 287–307).
- **Dalgleish D. G., Corredi M., (2012) :** The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*,p 3, 449-467.
- **Dash Priyanka., & Gosh, G., (2016) :** Proteolytic and antioxidant activity of protein fractions of seeds of *Cucurbita moschata*. *Food Bioscience*, p18, 1-8
- **Debry G., (2001) :** "Lait, nutrition et santé", Edition Tec & Doc Lavoisier, paris. P544.

□

- **Devaraj K.B, Gowda Lalitha R et Prakash V. (2008b) :** An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (.). *Phytochemistry* 69 : p 647–655.
- **Eck A et Ghilis J. (2006) :** Le fromage., la voiser TEC et DOC 3 eme édition., p891.
- **F.A.O. / O.M.S., (2009) :** Codex alimentarius : lait et produits laitiers. Ed. : 2. FAO - OMS., Rome, p136.
- **Ghaoues S. (2011) :** Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien.
- **Gordin S., Rosenthal I., (1978) :** Efficacy of chicken pepsin as milk clotting enzyme. *Journal of food protection* September Vol. 41 N° 9.p 684-688.
- **Gosta F., (1995). :** Le tout sur le lait. Manuel de transformation du lait. Ed. Tétrapack. P424.
- **Green ML and Stackpoole A (1975) :** The preparation and assessment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase–swine pepsin mixture for Cheddar cheese-making. *Journal of Dairy Research* 42 : p297-312.
- **Grzonka Z, Kasprzykowski F and Wiczak W (2007) :** Cysteine proteases, in *Industrial enzymes* pp 181-195, Springer.
- **Guevara, Gabriela Maria, et Gustavo Daleo Raul. (2018) :** Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes. *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*
- **Haard N. F., Shamsuzzaman K., Brewer P., Arunchalam K., (1982) :** Enzymes from marine organisms as rennet substitutes. In : Dupuy P. *Utilisation des enzymes en technologie alimentaire*. Lavoisier, Techn. et Doc., Paris, p.p. 237 – 241.
- **Harboe M, Broe M and Qvist K (2010) :** The production, action and application of rennet and coagulants. *Technology of cheesemaking* 2. Obtenu à Ngaoundéré (Adamaoua, Nord Cameroun). *Cameroon Journal of Academic Science*, p1, 14-19.
- **J.O.R.A. N° 69., (2003) :** Arrêté interministériel du 18 aout 1993 relatif aux spécification et à la présentation de certains laits de consommation. Textes législatifs. Lait et produits laitiers.
- **Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P., Brulé G., (2008) :** Les produits laitiers. Ed. : 2. *Techniques et Documentation – Lavoisier*, Paris, p185.

□

- **Jeantet, Romain, Sarah Nasser, Anne Moreau, Alain Hédoux, et Guillaume Delaplace. (2017) :**« Influence of storage conditions on the functional properties of micellar casein powder ». Food and Bioproducts Processing 106 : p181-92
- **Kassa KS, ahounou S, Dayo GK, Salifou C, Issifou MT, Dotché I, Gandonou PS, Yapi- Gnaoré V, Koutinhoun B, Mensah GA, Youssao IAK. (2016) :** Performances de production laitière des races bovines de l’afrique de l’ouest. Int. J. Biol.Chem. Sci., 10 (5) : p2316-2330.
- **Kellil S. (2015) :** Purification et caractérisation d’une enzyme coagulante d’origine Microbienne pour application en fromagerie. Thèse de Doctorat, Université Bougara, Boumerdes.p 24.
- **Kurutahalli S., Vishwanatha K. S., Appu Rao A. G., Singh S. A. (2010) :** Production and Laitiers. Ed. Tec& Doc, Lavoisier, p185.
- **Lapointe-Vignola C (2002) :** Science et technologie du lait : transformation du lait, Presses inter Polytechnique. Lavoisier, Technique Et Documentation, Lavoisier, France ; Pp 24-102.
- **Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O., (2001) :** Industrial use of enzymes. Laboratory Bioproc. Eng., Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.
- **Libouga D. G., JiwouaNgounou C. N., Kouebou C. P., (2013) :** Etude du lait de zébu
- **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) :** Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193 : p265-275.
- **Lucey J (2002) :** Formation and physical properties of milk protein gels. J. Dairy Sci. 8 : p281-294.
- **Mahaut M., Jeantet R., Brulé G., (2003) :** Initiation à la technologie fromagère. Techniques et Documentation – Lavoisier, Paris, p194.
- **Marchin S., Putaux J-L., Pignon F., Léonil J. (2007) :** Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small angle x-ray scattering/ultrasmall angle x-ray scattering. The Journal of Chemical Physics, p126, 045-101
- **Masfufatun, (2009) :** Isolasi dan karakterisasi enzim selulase.<http://fk.uwks.ac.id/archive/journal/vol.> [12 june 2019].

□

- **Mechakra A, Auberger B, Remeuf F and Lenoir J (1999)** : Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. Sciences des aliments 19 : p663-675.  
**Morsli A. (1996)** : Recherche sur les activités protéasiques des extraits de *Cynara scolytums*, du latex de *Ficus carica* et du proventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Mém. Mag., Institut National Agronomique, El Harrach, Alger, p181.
- **Murlidhar, M., Anusha, R., & Bindhu, O. S. (2017)** : Plant-based coagulants in cheese making. In Dairy engineering (pp. 51–84). Apple Academic Press.
- **Nouani A, Hamrani L, Bellal M. (2011)** : Purification et caractérisation de protéase coagulant le lait extrait à partir du proventricule de poulet (*Gallus gallus*). Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 29 et 30 mars 2011.
- **Özer B, Akardere E, Çelem EB and Önal S (2010)** : Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. Biochemical Engineering Journal 50 : p110-115.
- **Patel R., Dodia M., Singh S.P., (2005)** : Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. : Production and optimization. Proc. Biochem., 40 ; 3569– 3575.
- **Payne T. C. (2009)** : Enzymes in Meat Systems Enzymes. Chapter 8. R. Tarté (ed.), Ingredients in Meat Products : Properties, Functionality and Applications. P26.
- **Petropoulos, Spyridon, Ângela Fernandes, Carla Pereira, Nikos Tzortzakis, Josiana Vaz, Marina Soković, Lillian Barros, et Isabel C F R Ferreira. (2019)** : Bioactivities, chemical composition and nutritional value of *Cynara cardunculus* L. seeds. Food Chemistry. Elsevier Ltd.
- **Polaina J., Maccabe A.P., (2007)** : Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications. Springer. Netherlands. Proteolytic Enzymes. Ed., Perlmann G.E. and Lorand L, Acad.Press Inc., New York Volume 19, pp347-358, p 1042.
- **Porto ALF., (2005)** : Milk-clotting protease production by *Nocardiosis* sp. In an inexpensive medium. World J Microbiol Biotechnol 21 : p151–154.
- **Ramet J.P., (1997)** : Les agents de la transformation du lait. p.p. 165 – 174. In : Eck A., Gillis J.C. Le fromage : de la science à l'assurance qualité. Ed. : 3. Techniques et Documentation – Lavoisier, Paris, p891.



□

- **Robitaille G, Lapointe C, Leclerc D and Britten M (2012)** : Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropeptide on Escherichia coli and Lactobacillus rhamnosus in acidic conditions. Journal of dairy science 95 : p1-8.
- **Ronez, Florian. (2012)** : « Exploration fonctionnelle et valorisation industrielle de la protéine de choc thermique bactérienne Lo18 ». <http://www.theses.fr>, avril.
- **Sandhya C., Nampoothiri K.M., Pandey A., (2005a)** : Microbial proteases. Methods Biotechnol., 17 ; 165–179.
- **Shah MA, Mir SA and Paray MA (2014)** : Plant proteases as milk-clotting enzymes incheesemaking: à review. Dairy Science & Technology 94 : p5-16.
- **Siar H (2014)** : Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait. Mémoire de Magister, Université Constantine 1. P17-32. Constantine. Institut de la Nutrition, Alimentation et des Technologies Agroalimentaires. P105.
- **Sousa M.J., 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, p82, 151–170
- **St-Gelais D., Tirard-Collet P., (2002)** : Fromage. Dans : Science et technologie du lait : Transformation du lait. Presses internationales Polytechnique, Montréal, p349 -415.
- **Temiz H., Aykut U., Okumus E., Turhan S., (2007)** : The partial purification and properties of pepsin obtained from Turkey proventriculus. Biotechnology and Bioprocess Engineering, p 12, 450–456.
- **Temiz H., Okumus E., Aykut U., Dervisoglu M., Yazici, F., (2008)** : Partial purification of pepsin from Turkey proventriculus. World Journal of Microbiology and Biotechnology, p 24, 1851–1855.
- **Vilain, A. C** : Qu'est-ce que le lait ? What's milk ? (en ligne). France : Elsevier. Masson, 2010, p.124-127. Disponible sur : [www.sciencedirect.com/](http://www.sciencedirect.com/) consulté le (27/05/2022)
- **Zikiou, Abdellah, (2013)** : « La coagulation du lait par l'extrait des fleurs de cardon (Cynara cardunculus) ». Université Constantine -1.

### Sites web

**Anonyme : <https://www.youlab.fr/blog/ressources-scientifiques-bibliographie/le-lait-etsacoagulation/> (Consulté le 15.05.2022 à 23.00 h).**

# *Annexes*

**Annexe I : Dosage des protéines par la méthode (Bradford, 1976).****I-1 Préparation de réactif de BRADFORD**

-100mg de bleu de Coomassie G-250 ;

-50 ml d'éthanol à 95% ;

-Compléter avec l'eau distillée jusqu'à un volume de 1000 ml ; Ce réactif doit être conservé à 4°C et à l'abri de la lumière.

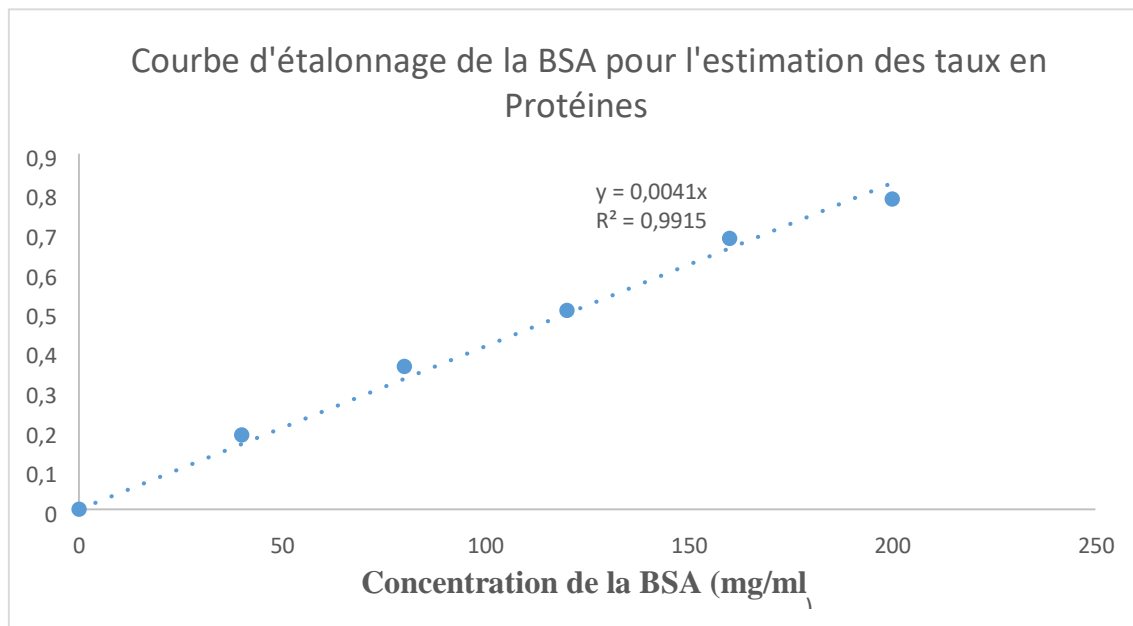
**I-2 Elaboration de la courbe d'étalonnage des protéines**

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumin bovine (BSA) (1mg/ml) selon les quantités suivantes : 0, 100, 200, 300, 400 et 500 µl. Toutes les dilutions des solutions protéiques sont effectuées en présence de l'eau distillée. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 500µl.

Après addition de 2ml du réactif de Bradford et agitation, la solution est laissée à l'obscurité 15min puis l'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc.

**Tableau I : Préparation de la gamme d'étalonnage de la SAB (1mg/ml)**

N° tube	Blanc	1	2	3	4	5
BSA (µl)	0	200	400	600	800	1000
Eau distillée (µl)	1000	800	600	400	200	0
Total (µl)	1000					
Solution BSA(µl)	500					
Réactif Bradford (µl)	2000					



**Figure 1** : Courbe d'étalonnage de la solution de SAB (1 mg/ml) Bradford, (1976).

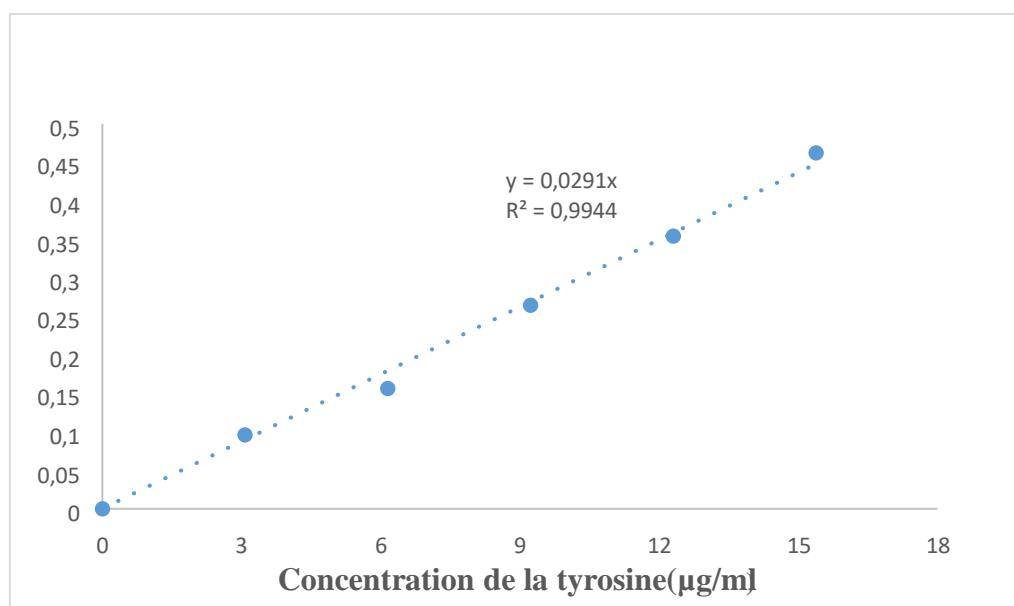
## Annexe II : Mesure de l'activité protéolytique

### II-1 Courbe d'étalonnage de la tyrosine

**Tableau II** : Préparation de la gamme d'étalonnage de la Tyrosine (250 $\mu$ g/ml)

#### Concentration de la tyrosine ( $\mu$ g/ml)

<b>tube</b>	Blanc	1	2	3	4	5
<b>Dilution</b>	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
<b>Tyrosine (<math>\mu</math>l)</b>	0	200	400	600	800	1000
<b>Tampon phosphate 0,1 M pH 7 (<math>\mu</math>l)</b>	1000	800	600	400	200	0
<b>Solution tyrosine (<math>\mu</math>l)</b>	500					
<b>Solution C (ml)</b>	2,5					
Incubation à 35°C pendant 10 min,						
<b>Folin-Ciocalteu (<math>\mu</math>l)</b>	250					
Incubation à 35°C pendant 20 min,						
Lire l'absorbance à 660 nm						



**Figure 2** : Courbe d'étalonnage obtenu avec la tyrosine.

### **Annexe III :**

#### **Appareillage utilisé aux Laboratoires**

- Balance de précision à 0,01g (SARTORIUS);
- Centrifugeuse (SIGMA) ;
- ph mètre (Hanna-instruments) ;
- Spectrophotomètre UV-Visible (SCHIMADZU, Japon) ;
- Bain marie
- Etuve
- Micropipettes
- Seringues
- Eppendorfs
- Equipements de protection individuelle
- La verrerie (bêchers, fioles jaugées, pipette graduées, tubes à essais, tubes à centrifugation, ...)

#### **Produits et réactifs spécifiques**

- Colorants et réactifs : bleu de Coomassie G-250, TCA 5%, acide sulfurique, soude, tyrosine, phosphate de sodium monobasique et dibasique, réactif de Folin-Ciocalteu, carbonate de sodium, tartrate sodium-potassium, sulfate de cuivre ...).
- Sérum albumine bovine (BSA),
- Caséine 1% ;
- Chlorure de calcium

## **Résumé**

L'objectif du présent travail est l'extraction et la caractérisation de protéases végétales de la camomille et de la pepsine animal du poulet et l'étude de la possibilité de leur emploi comme succédanés de présure. La caractérisation physicochimique a permis de déterminer la teneur en protéine, l'activité coagulante, la force coagulante, et l'activité protéolytique des extraits enzymatiques obtenu. L'étude de l'influence des paramètres physicochimiques du lait (pH, température, concentration en  $\text{CaCl}_2$  et de la concentration de l'extrait enzymatique) sur l'activité coagulante des protéases végétales et de la pepsine animale a été réalisée. Les résultats montrent que les extraits enzymatiques surtout la pepsine de poulet ont des activités protéolytiques et coagulantes nettement supérieures à celle de la présure. En conclusion, les caractéristiques de ces enzymes indiquent qu'elles peuvent être utilisées comme substitut de présure.

**Mots-clés :** extraction, succédané de présure, coagulation, activités coagulantes.

## **Abstract**

The objective of this work is the extraction and characterization of plant proteases from Chamomille and animal pepsin from chicken and the study of the possibility of their use as a rennet substitute. The physicochemical characterization made it possible to determine the protein content, the coagulant activity, the coagulant force, and the proteolytic activity of the obtained enzymatic extracts. The study of the influence of the physicochemical parameters of milk (pH, temperature,  $\text{CaCl}_2$  concentration and the concentration of the enzymatic extract) on the coagulant activity of plant protease and animal pepsin was carried out. The results show that all enzymatic extracts especially pepsin of chicken have proteolytic and coagulant activities that are clearly superior to that of rennet. In conclusion, the characteristics of these enzymes indicate that they can be used as a substitute for rennet.

**Key-words :** extraction, rennet substitute, coagulation, coagulant activities.