

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



Réf :.....

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

**MASTER**

*Thème*

Recherche de succédanés de la présure d'origine  
végétale

Présenté par :

**Maibeche Faïda & Louchiche Lynda**

Soutenu le : **12 Septembre 2022**

Devant le jury composé de :

Mme. BOULKBACHE Lila  
Mr. BOUKHALFA Farid  
Mme. MEKHOUKHE Aïda

Professeur     Présidente  
MCA             Encadreur  
MCA             Examinatrice

**Année universitaire : 2021 / 2022**

## *Remerciements*

*Nos remerciements les plus sincères et les plus chaleureux à dieu tout puissant qui a inséré dans nos cœurs la patience et le courage nous permettrons ainsi de réaliser ce travail.*

*Un grand merci à notre promoteur **Mr BOUKHALFA Farid** pour le sujet et d'avoir accepté de diriger ce travail, son implication et sa confiance, merci de nous avoir accueillies dans ton laboratoire avec un grand cœur, pour ses conseils précieuse et son temps.*

*Un merci chaleureux aux membres de jury **Mm BOULKBACHE Lila** et **Mm MEKHOUKHE Aïda** pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour leurs corrections qui sont permis d'améliorer ce manuscrit.*

*Notre remerciement s'adresse également à l'ensemble du personnel de la lacterie **Soummam** et tous l'équipe du laboratoire de contrôle de qualité et physico chimie 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.*

*Un grand merci pour tous nos enseignants depuis la première année jusqu'à cette année et tous l'équipe de laboratoire de département science de la nature et de la vie.*

*Enfin, nous remercions infiniment nos famille, nos amis qui ont été là dans les bons comme dans les mauvaise moments, pour leurs soutien inestimable et leur accompagnement jusqu'au jour de la soutenance.*

## *Dédicace*

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,  
J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A la lumière de mes yeux l'ombre de mes pas et le bonheur de ma  
vie ma mère qui mon appui durant toutes mes années d'étude,  
pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage &  
sécurité.*

*A mon chère père qui m'a appris le sens de la persévérance tout  
au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils ses  
encouragement.*

*A toute ma famille **Maibeche, Taourí***

*Mes chers frères et sœurs & mon petit ange **KIkiche***

*A toute ma famille, proche ou éloignée.*

*A tous mes Amis*

*A mon binôme **\*Lynda\*** qui a partagée avec moi les moments  
difficiles de ce travail et sa famille.*

*Sans oublier mes brave Amies de la promotion.*

***Faída***

## *Dédicace*

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,*

*J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A la lumière de mes yeux l'ombre de mes pas et le bonheur de ma  
vie ma mère qui mon appui durant toutes mes années d'étude,  
pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage  
et sécurité.*

*A mon chère père qui m'a appris le sens de la persévérance tout  
au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils ses  
encouragement.*

*A toute ma famille Louchiche, Alloul*

*Mes chères frères, ma belle-sœur et mon petit ange Ayden,*

*A toute ma famille, proche ou éloignée.*

*A tous mes Amis*

*A mon binôme \*Faïda\* qui a partagée avec moi les moments  
difficiles de ce travail et sa famille.*

*Sans oublier mes brave Amies de la promotion.*

*Lynda*

## *Sommaire*

*Liste des abréviations.*

*Liste des figures.*

*Liste des tableaux.*

**Introduction**..... 01

### *Synthèse bibliographique*

I. Généralités sur le lait.....	03
II. Composition chimique du lait.....	03
III. Micelles de caséine.....	05
IV. Coagulation du lait.....	06
➤ Coagulation par voie acide.....	06
➤ Coagulation mixte.....	06
➤ Coagulation par voie enzymatique.....	06
a. Phase primaire ou d'hydrolyse enzymatique.....	07
b. Phase secondaire ou phase d'agrégation.....	07
c. Phase tertiaire ou de formation du gel.....	08
V. Enzymes coagulants du lait.....	08
VI. Succédanés de la présure.....	08
VI.1 Succédanés de la présure d'origine animale.....	09
VI.2 Succédanés de la présure d'origine végétale.....	09
VI.3 Succédanés de la présure d'origine microbienne.....	09
VII. Exemple des succédanées de la présure.....	10
➤ Ficine.....	10
➤ Urtica.....	10
➤ Silybum marianum.....	11
➤ Malva sylvestris.....	11
➤ Ricinus communis.....	11

### *Matériels et méthodes*

I. Matériels et méthodes.....	12
I.1 Matériels végétales.....	12
I.2 Extraction et préparation des extraits enzymatiques.....	13

# Sommaire

I.2.1 Procède d'extraction de l'enzyme végétale.....	13
I.2.2 Préparation de l'extrait enzymatique de présure .....	13
I.3 Caractérisation physico-chimique de l'extrait brut .....	14
I.3.1 Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques .....	14
I.4 Mesure des activités enzymatiques .....	15
I.4.1 Détermination de l'activité protéolytique .....	15
I.4.2 Évaluation de l'activité coagulante .....	16
I.5 Etude des paramètres influençant l'activité enzymatique .....	17
I.5.1 Effet de la température sur l'activité coagulante.....	17
I.5.2 Effet du potentiel d'hydrogène sur l'activité coagulante .....	18
I.5.3 Effet de la concentration en CaCl <sub>2</sub> sur l'activité coagulante .....	18
I.5.4 Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité coagulante .....	18

## *Résultats et discussion*

II. Résultats et discussion .....	19
II.1 Caractérisation physicochimiques des extraits étudiés .....	19
II.2 Teneur en protéines et activités enzymatiques des extraits étudiés .....	20
II.2.1 Activité coagulante .....	22
II.2.2 Activité protéolytique .....	23
II.2.3 Dosage des protéines.....	23
II.3 Détermination des conditions optimales de coagulation des extraits enzymatiques étudiés .....	24
II.3.1 Effet de la température sur l'activité des extraits étudiés .....	24
II.3.2 Effet du pH sur l'activité coagulante des extraits bruts étudiés .....	25
II.3.3 Effet de la concentration de CaCl <sub>2</sub> sur l'activité des extraits bruts étudiés.....	29
II.3.4 Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante des extraits bruts .....	31

## *Conclusion*

<b>Conclusion</b> .....	34
-------------------------	----

*Reference bibliographique.*

*Annexe.*

*Résumé.*

*Liste des abréviations*

**AA** : Acide Amine.

**CMP** : Caséinomacropéptide.

**MCA** : Activité coagulante du lait.

**MCE** : Enzyme coagulant du lait

**MS** : Matière sèche.

**O.N.S** : Office National des Statistiques.

**PA** : Activité Protéolytique.

**TCA**: Tri Chloroacetic Acid.

**UP** : Unité de présure.

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

**USDA** : Département de l'Agriculture des États-Unis.

**His** : Histidine.

**Arg** : Arginine.

**Lys** : Lysine.

# Liste des figures

---

## *Liste des figures*

<b>Figure 01</b> : Modèle de micelle de caséine avec sous-unités.....	05
<b>Figure 02</b> : Hydrolyse de la caséine $\kappa$ par la présure .....	07
<b>Figure 03</b> : photographies des succédanés d'origine végétale étudiés .....	12
<b>Figure 04</b> : Représentation graphique de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés .....	25
<b>Figure 05</b> : Représentation graphique de l'influence du pH sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés .....	27
<b>Figure 06</b> : Représentation graphique de l'influence du pH sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique de présure .....	28
<b>Figure 07</b> : Représentation graphique de l'influence de la concentration du $\text{CaCl}_2$ sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés .....	30
<b>Figure 08</b> : représentation graphique de l'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.....	32

*Liste des tableaux*

**Tableau I:** Composition générale du lait en g/100mL.....03

**Tableau II:** Caractéristiques physicochimiques des extraits enzymatiques étudiés .....19

**Tableau III :** Teneur en protéines et activités enzymatiques des extraits étudiés .....21

# *Introduction*

## Introduction

Le lait est l'un des produits de base de l'alimentation humaine. Il est comme la plupart des matières premières d'origine biologique, très périssable et s'altère rapidement par voie microbienne et enzymatique ce qu'a contraint l'homme à rechercher des moyens de différer cette problématique. Ainsi, plusieurs procédés de transformation du lait en produits dérivés (fromages, laits fermentés, laits en poudre) sont apparus depuis des siècles (**Eleya et al., 1996**).

La fabrication du fromage a existé depuis 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 (**Jeantet et al, 2017**).

L'étape clé de la réussite d'un fromage est la coagulation. Il existe essentiellement deux types de coagulation ; l'une par acidification souvent réalisée à l'aide de ferments lactiques qui métabolise le lactose en acide lactique, et l'autre enzymatique par dégradation de la caséine  $\kappa$  sous action d'une enzyme dont la plus utilisée est la présure (**Boughellout, 2007**).

La présure est obtenue à partir d'estomacs de veau dont son principal composant est la chymosine, mais dans les préparations commerciales elle renferme à des concentrations variables d'autres protéases, généralement la pepsine bovine (**Alavi et Momen, 2020**). Ces dernières années, avec l'expansion de la production mondiale de fromage, il est devenu de plus en plus difficile de fournir des estomacs de veau adéquats à partir desquels la présure peut être obtenue (**Ben Amira et al., 2017a**).

Dans l'industrie fromagère s'est imposée pour des raisons sociales et religieuses telles que l'utilisation interdite de la présure dans certains pays comme l'Inde et Israël, ainsi que le manque de stabilité de la qualité, des prix et la difficulté d'approvisionnement en présure (**Siar, 2014**).

Ces raisons ont fait que de nombreuses recherches ont été entreprises afin de trouver des succédanés efficaces et compétitifs utilisables industriellement. Parmi ces succédanés, les protéases d'origine végétale sont très anciennement utilisées dans des préparations traditionnelles telles que celles provenant de l'artichaut, du chardon et de latex du figuier. D'autres enzymes ont été testées telles que les protéases d'origine fongique synthétisées par diverses espèces. Il existe aussi des succédanés d'origines animales telles que les pepsines porcines, bovines et les pepsines extraites des proventricules des volailles (**Siar, 2014**).

En Algérie, la consommation de produits laitiers continue de croître avec la demande croissante de la population, les achats sur le marché international ont dépassé le cap du milliard de dollars. En 2019, les importations de produits laitiers par l'Algérie sont élevées à 1,24 milliard \$. C'est ce qu'indique le département américain de l'agriculture (USDA) dans sa dernière note sur la filière. (**Ecofin, 2020**). L'Algérie utilise environ 1,5 tonne par an de présure ou de ses succédanés d'origine Microbienne dans la préparation de fromages à coagulation enzymatique. Cette quantité coûte approximativement 102 000 \$, somme équivalente à 7,5 millions de DA (**ONS, 2019**).

L'objectif de ce travail est la contribution à la recherche de nouvelles sources de protéases disponibles à moindre coût, à partir de plantes endémiques du sol algérien

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

*Partie*  
*bibliographique*

## I. Généralités sur le lait

Le lait a été défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne comportant pas de colostrum » (Mekhaneg, 2020).

C'est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles après la naissance du jeune. Il s'agit d'un fluide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté, d'une saveur douceâtre et d'un pH (6,6 à 6,8) légèrement acide, proche de la neutralité (Mekhaneg, 2020).

## II. Composition chimique du lait

Le lait est un produit d'origine biologique fortement altérable par voie microbienne et par voie enzymatique. C'est un milieu multiphasique : une phase aqueuse contenant essentiellement le lactose, les minéraux ; une phase dispersée de nature lipidique (globules gras) et une phase de nature protéique (micelles de caséines).

La composition moyenne du lait (**Tableau I**) varie selon différents facteurs liés à l'animal à savoir ; la race, la période de lactation, le type et la nature de l'alimentation, la saison et l'âge (Amiot *et al.*, 2002).

**Tableau I** : Composition générale du lait en g/100mL (Amiot *et al.*, 2002).

Composants	Valeur moyenne (g/100mL)
Eau	87,5
Matières grasses	3,7
Protéines	3,2
Glucides	4,6
Minéraux	0.9

L'eau, le composant majoritaire, conditionne l'état physique des autres constituants, en intervenant dans l'émulsion de la matière grasse et la dispersion des micelles de caséines. L'eau intervient dans le développement microbien et les altérations enzymatiques et non du lait (Talantikite, 2015). Lors de la transformation environ 75 à 80% de cette eau est retrouvée dans le lactosérum avec la majorité des composants polaires (lactose, vitamine hydrosolubles) (Mahaut *et al.*, 2000).

Les glucides du lait se présentent sous la forme du lactose à une dose de 47 à 52 g/l, c'est le glucide le plus abondant du lait de vache. Il joue un rôle important, lié notamment à sa valeur nutritionnelle et à sa fermentescibilité qui commande l'élaboration de divers produits laitiers. C'est un disaccharide réducteur qui existe sous deux formes isomères  $\alpha$  et  $\beta$ , formes se distinguant par certains caractères physiques (**Mahaut et al., 2000**).

La matière grasse du lait se présente sous la forme de petits globules sphériques qui sont invisibles à l'œil nu (**Amiot et al., 2002**). Elle se compose principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable, constituée en grande partie de cholestérol et de  $\beta$ -carotène.

Les protéines du lait, qui représentent 95% de la matière azotée du lait, se trouvent sous deux types : les caséines (80%) et les protéines du sérum (20%). Les composés azotés non protéiques du lait sont des protéases, des peptones et de l'urée (**Dussault-Chouinard, 2019**).

La caséine entière constitue 80% des protéines du lait, et se trouve sous forme micellaire. Il existe quatre principaux types de caséines, les caséines  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ . Parmi les caséines, la  $\kappa$ -caséine est la moins phosphorylée et la moins sensible à la précipitation par le calcium (**Britten et Giroux, 2022**). De plus, la  $\kappa$ -caséine est la seule caséine glycosylée, ce qui lui confère un caractère hydrophile (**Britten et Giroux, 2022**). Il existe également une caséine  $\gamma$  qui provient de l'hydrolyse de la caséine  $\beta$  par la plasmine (**Krid et al., 2013**).

La caséine  $\alpha_{S1}$  possède 199 acides aminés et un poids moléculaire de 23 kDa, ce qui en fait la protéine la plus importante en termes de masse. Cette caséine est extrêmement sensible au calcium au pH normal du lait (pH=6,7) quelle que soit la température et en présence de calcium, on constate une formation de flocons (**Mekhaneg, 2020**).

La caséine  $\alpha_{S2}$  possède 207 AA et 13 à 10 phosphates ( $\alpha_{S2}$  ou  $\alpha_{S3}$  ou  $\alpha_{S4}$  ou  $\alpha_{S6}$  selon le nombre de phosphates) et son poids moléculaire estimé à 25kDa, elle représente 8 à 11% de la micelle de caséine (**Mekhaneg, 2020**).

La Caséines  $\beta$  représentant 25 à 35% de la micelle, avec ses 209 AA et ses 5 groupements phosphates, elle possède beaucoup d'analogie avec la caséine  $\alpha_{S1}$  (**Mekhaneg, 2020**).

La Caséines  $\gamma$  s'agit des fragments C-terminaux résultant de la protéolyse de la caséine  $\beta$  par la plasmine (**Mekhaneg, 2020**).

La Caséines  $\kappa$  s'agit d'une protéine de 169 AA, phosphorylée (Serine 149) comportant deux variantes génétiques A et B. Elle comporte un constituant majeur non glycosylé et des

constituants mineurs glycosylés dont la structure précise est élucidée Une grande majorité de cette caséine se trouve à la surface de la micelle, accessible à la présure. (Mekhaneg, 2020).

### III. Micelles de caséine

Les caséines ont la particularité de se regrouper sous forme de micelles d'un diamètre moyen de 180 nm, qui sont formées à 92% de protéines et à 8% de minéraux (Figure 01). De plus, elles contiennent 3-4 kg d'eau par kg de protéine (Dussault-Chouinard, 2019).

La micelle de caséine est une matrice homogène de caséines dans laquelle sont dispersés les nanogroupes de phosphate de calcium. Les protéines s'associent entre elles par des interactions faibles, soit des interactions hydrophobes, des ponts hydrogènes ou encore de faibles attractions de Van der Waals (De Kruif *et al.*, 2012).

La charge nette des micelles est négative, ce qui leur permet de se repousser entre elles. Dans leur état natif, les micelles de caséines sont très stables. Elles peuvent être chauffées à 100°C et pressurisées à 100 MPa sans perdre leur intégrité (Dussault-Chouinard, 2019). Les grosses micelles ont une charge minérale plus élevée et des proportions relatives de caséines  $\beta$  et  $\kappa$  plus faibles que les petites (Talantikite, 2015).

Les micelles de caséines se précipitent toutefois sous l'effet de la présure ou de l'acidité à PH 4,6. Le gel formé par la coagulation des caséines, qui retient plus ou moins selon le cas la matière grasse, les minéraux, l'eau et les éléments solubles, est la base de produits tels le fromage et le yogourt (Dussault-Chouinard, 2019).

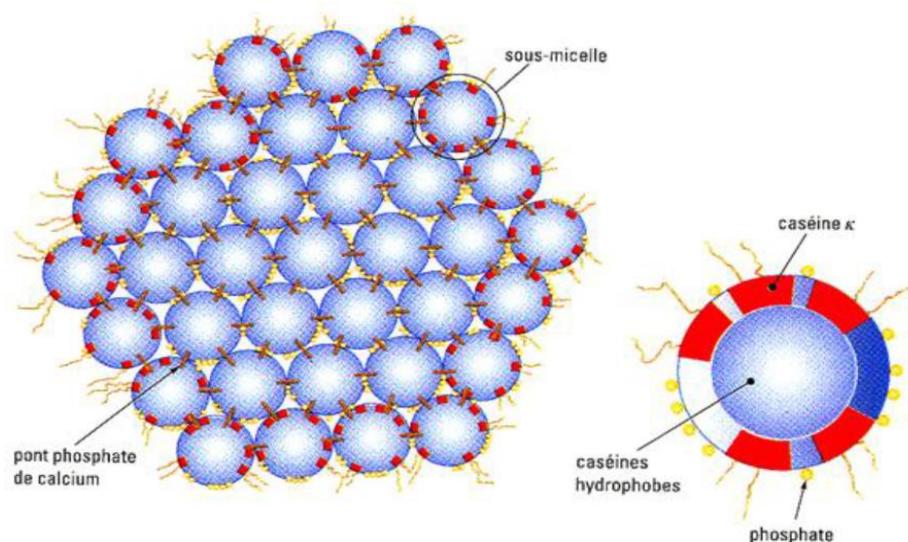


Figure 01 : Modèle de micelle de caséine avec sous-unités (Amiot *et al.*, 2002)

#### IV. Coagulation du lait

La coagulation du lait est une étape importante dans le processus de fabrication du fromage (Talantikite, 2015). Elle correspond à une modification d'état physique irréversible des micelles de caséines. Celle-ci entraîne un passage du lait de l'état liquide à l'état semi-solide après formation d'un réseau protéique tridimensionnel appelé coagulum ou gel (Amimour, 2019). Elle est peut être obtenue par abaissement du pH (acidification), par action des enzymes coagulantes ou par action mixte.

##### ➤ Coagulation par voie acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ( $\text{pH}=4.6$ ) par acidification biologique à l'aide des ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique ou par acidification chimique (injection de  $\text{CO}_2$ , addition de glucono-delta-lactone ou ajout de protéines sériques à pH acide). La voie chimique (acide organique) est uniquement utilisée en France pour la standardisation du pH du lait avant emprésurage. L'addition d'acide minéral n'est quant à elle pas autorisée (Talantikite, 2015).

##### ➤ Coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. La multitude de combinaisons conduisant à différents états d'équilibres spécifiques est à l'origine de la grande diversité des fromages à pâte molle et à pâte pressée non cuite (Mahaut et al., 2000).

Les gels formés par cette coagulation mixte possèdent des caractéristiques intermédiaires entre celles du gel obtenu par voie acide et celle du gel obtenu par voie enzymatique (Amimour, 2019).

##### ➤ Coagulation par voie enzymatique

La coagulation par voie enzymatique du lait s'effectue par l'hydrolyse des caséines par le biais des enzymes protéolytiques d'origine animale (veau, porc, poulet), végétale (artichaut, chardon, graines de citrouille) et microbienne (enzymes extraits de certains champignons, comme : *Mucorpusills*, *Endothiaparasitica*), ayant la propriété de coaguler le lait. L'enzyme animale la plus utilisée en fromagerie est la présure, provenant du sac gastrique (la caillette) des jeunes ruminants non sevrés (Amimour, 2019). La présure de veau était le premier MCE utilisé pour la fabrication du fromage, et cette enzyme est également connue pour sa grande spécificité pour le clivage du caséinmacropeptide de la  $\kappa\text{-ca}$ .

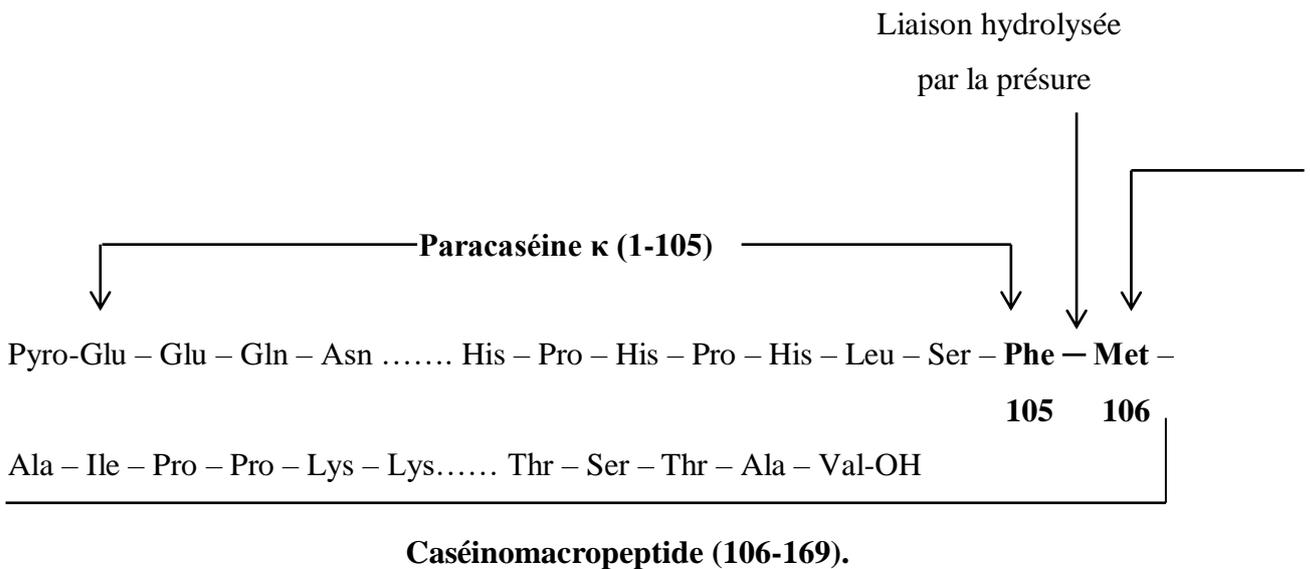
La présure de veau était le premier MCE utilisé pour la fabrication du fromage, et cette enzyme est également connue pour sa grande spécificité pour le clivage du caséinomacropeptide de la  $\kappa$ -caséine (Ribeiro et al., 2017). Cette voie comporte trois phases :

#### a. Phase primaire ou d'hydrolyse enzymatique

Elle concerne l'hydrolyse de la caséine  $\kappa$ , au niveau de la liaison peptidique phénylalanine (105) et méthionine (106), qui conduit à la formation de paracaséine  $\kappa$  (1-105), et de CMP (106-169) (figure 02).

La libération du CMP se traduit par une réduction du potentiel de surface des micelles et en conséquence, une diminution des répulsions électrostatiques qui à l'état initial contribue à la stabilité du système colloïdal (Talantikite, 2015).

Cette phase est indépendante des ions de  $\text{Ca}^{2+}$  et elle se produit à des températures variées (de 0 à 50°) (Talantikite, 2015).



**Figure 02** : Hydrolyse de la caséine  $\kappa$  par la présure, (FOX et al., 1994).

#### b. Phase secondaire ou phase d'agrégation

Elle correspond à la phase physique, au cours de laquelle les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes. L'agrégation devient possible lorsqu'un certain degré d'hydrolyse est atteint puisqu'il existe un niveau minimum de caséine  $\kappa$  nécessaire à la stabilisation de la micelle (Benkahoul, 2016). Selon Mahaut et al., (2000) la réaction secondaire ne commence que lorsque le taux d'hydrolyse de la caséine  $\kappa$  atteint 80 à 90%.

### c. Phase tertiaire ou de formation du gel

Les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations : des liaisons de nature variée s'établissent entre les micelles (électrostatiques, hydrophobes et salines) pour former un gel constitué par un réseau lâche emprisonnant le lactosérum et la matière grasse (Mekhaneg, 2020).

## V. Enzymes coagulantes du lait

Les enzymes coagulantes, la présure ou ses substituts, sont des endopeptidases appartenant au groupe des aspartyl protéases. Ces enzymes ont une double activité : l'une très spécifique sur la caséine  $\kappa$ , l'autre de protéolyse générale portant sur toutes les protéines, qui sont susceptibles de se manifester aux cours de l'affinage des fromages (Talantikite, 2015).

La majorité des enzymes coagulants le lait sont connues comme des protéases à aspartate et sont distribuées d'une façon endémique chez la plupart des vertébrés, plantes, levures, parasites fungi et virus (Naouni., 2009).

La présure de veau est la préparation coagulante traditionnelle la plus utilisée pour la coagulation du lait. De moindres quantités sont obtenues à partir de l'estomac de chevreau et d'agneau. La dénomination présure est réservée à l'extrait coagulant provenant de la troisième poche de l'estomac appelée caillette (Talantikite, 2015). Elle renferme deux enzymes actives, la chymosine et la pepsine.

La chymosine est la protéase majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale. Elle est stable entre pH 5 et 6 ; son activité est optimale à pH voisins de 5 ; elle est inactivée à pH 7,5 et dénaturée à pH 8. Sa température optimale d'action est voisine de 40°C, l'inactivation thermique a lieu dès 50°C. elle est totale à 61°C (Talantikite, 2015).

La pepsine est le constituant mineur de la présure dont la sécrétion gastrique ne devient prépondérante qu'après sevrage. Elle est produite sous forme d'un précurseur inactif, le pepsinogène. Il passe par acidification sous la forme active : la pepsine de poids moléculaire 35 kDa. Elle est thermosensible en solution après 55°C températures à 70°C. Elle est relativement stable à des pH compris entre 5 et 5,5. Son activité enzymatique est plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat (Talantikite, 2015).

## VI. Succédanés de la présure

La coagulation du lait est une étape importante pour la préparation du fromage. L'ancien coagulant utilisé en fromagerie est la présure. Cependant, et à la suite d'une pénurie mondiale

croissante, de nombreuses recherches ont été développées pour sélectionner des succédanés utilisables industriellement d'origines diverses : microbiennes, végétales et animales (**Krid et al., 2013**).

De nombreuses protéases sont capables de provoquer la coagulation du lait, mais toutes ne sont pas pour autant aptes à la fabrication fromagère car elles ne présentent pas les propriétés biochimiques et technologiques requises (**Talantikite, 2015**).

Les inconvénients majeurs de l'utilisation des protéases de remplacement sont dans certains cas, la baisse du rendement fromager (**Amiot et al., 2002**). Les protéases, en plus de leur activité coagulante, interviennent dans l'affinage des fromages. (**Mahaut et al., 2000**).

### **VI.1 Succédanés de la présure d'origine animale**

Les enzymes sécrétées par l'estomac des mammifères sont celles qui sont intéressantes pour la fromagerie. Dans cet intervalle sont incluses les pepsines de différentes espèces animales, principalement bovines, ovines, caprines, porcines et aviaires. Ces différentes pepsines sont parfois utilisées en mélange avec la présure à des proportions variables qui dépendent du type de fromage à préparer (**Krid et al., 2013**).

### **VI.2 Succédanés de la présure d'origine végétale**

Contrairement à la présure qui est spécifique à la  $\kappa$ -caséine, les aspartyl-protéases des plantes peuvent hydrolyser les caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ , ce qui provoque, une amertume et des défauts de texture des fromages et qui limite leur utilisation industrielle. Plusieurs préparations coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures.

L'utilisation de la fleur de cardon comme agent coagulant a été considérée comme l'un des facteurs déterminants de la qualité des fromages typiques portugais au lait de brebis. L'extrait coagulant du *Cynara cardunculus* a fait l'objet de nombreuses études.

D'autres végétaux fournissent des coagulases telles que les ficines extraites du latex du figuier, la papaïne du papayer, la bromélaïne de l'ananas (**Talantikite, 2015**).

### **VI.3 Succédanés de la présure d'origine microbienne**

Déférentes alternatives microbiennes sont utilisées pour la production de la présure, mais cette technologie n'est pas adaptée à la production de fromage de qualité. elles sont responsables du goût amer (**Walsh et li, 2000; Kumar et al, 2006**).

De nombreux espèces de bactéries ont été étudiées, notamment celles appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* (*Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus coagulans*). Les résultats ont été en général décevants en raison de l'activité protéolytique généralement très élevée de ces protéases par rapport à celle de la présure. La protéase de *Bacillus cereus* dégradait rapidement la caséine entière (Mekhaneg, 2020).

Il existe aussi des protéases fongiques qui ont donné de meilleurs résultats, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure (Mekhaneg, 2020).

## VII. Exemple des succédanées de la présure

### ➤ *Ficine*

La ficine, une enzyme extraite du latex du figuier, dont le nom botanique *Ficus carica* L., un arbre à feuilles caduques de la famille des Moraceae qui comprend environ 1500 espèces classées en 52 genres dont le genre ficus (Solomon et al. 2006; Nicotra et al. 2010; Mawaet al. 2013).

Le latex est une suspension aqueuse de couleur blanche, largement distribué dans la plante (Kim et al., 2008). Toutes les parties de l'arbre du genre *Ficus* contiennent du latex, il assure une protection et une autoréparation contre les agressions physiques (Lansky et al., 2008).

Par incision du tronc, on recueille le latex qui coagule rapidement : filtré puis desséché, il constitue la ficine brute. Elle peut être utilisée par l'industrie agroalimentaire (attendrissement des viandes, coagulation du lait), dans l'industrie textile, en pharmacologie, en cosmétologie et en immuno-hématologie pour la recherche d'anticorps irréguliers (Jean, 2009).

### ➤ *Urtica dioïca*

L'Ortie dioïque encore appelée la Grande Ortie, ou Ortie commune, est une plante herbacée vivace, vigoureuse et à longue durée de vie par un rhizome jaune rampant, nitrophile, couverte de poils crochus irritants elle peut atteindre 1,50 mètre de haut. C'est une des rares plantes que l'on peut reconnaître les yeux fermés. Elle est considérée comme une « mauvaise herbe », mais en réalité c'est une plante riche en vitamines et minéraux et pourvue de nombreuses vertus. Son utilisation est multiple, elle est employée à des fins médicinales en agriculture, en alimentation, en cosmétique, en teinturerie, dans l'industrie du textile (Ferraguena et Boudelioua, 2018).

Egalement en fromagerie, on utilise le jus d'ortie fortement salé pour faire cailler le lait. Contrairement à la présure, obtenue à partir de la panse des bovins, ce procédé a l'avantage d'être non violent et compatible avec un régime végétarien (**Delahaye, 2015**).

➤ ***Silybum marianum***

C'est une plante annuelle, ou bisannuelle qui atteint 1,5 mètre de haut ses feuilles brillantes, vertes marbrées de blanc, aux lobes découpés dont le bord denté est pourvu d'épines. Les tiges ramifiées à leur extrémité portent des touffes bien fournies de fleurs tubulaires, La floraison à lieu de juin à septembre. Le chardon Marie dans la famille des dipsacées de l'espèce «carduus». Elle est une plante médicinale très ancienne. On la recommandait déjà dans les plus importants traités de pharmacie du Moyen Age. (**Anonyme I**)

➤ ***Malva sylvestris***

C'est une plante vivace très rustique qui se rencontre à l'état sauvage dans les décombres, les bords de chemins et les haies, elle est de la famille des Malvacées qui fleurisse à partir du mois de mai et durant l'été. Elle forme une tige dressée avec des feuilles vert foncé arrondies découpées en 5 lobes peu profonds. Les fleurs de 4 à 6 cm de diamètre, en entonnoir éversé, comptent 5 pétales en forme de cœur d'un rose pourpré, décorées de stries violet foncé, avec des étamines soudées entre elles formant un tube. Lorsqu'elles se fanent, les fleurs bleuissent. Les petits fruits circulaires sont appelés "fromage" d'où le nom d'herbe à fromage. (**Anonyme II**)

➤ ***Ricinus communis***

Elle ne comprend qu'une seule espèce d'arbuste à feuillage persistant dans les régions douces. La plante pousse à l'état naturel sur les terrains en friches, sur les pentes rocailleuses et même parfois en bordure de routes, du Nord Est de l'Afrique à l'Ouest de l'Asie. Elle est utilisée dans la fabrication des huiles qui est ensuite utilisée dans le domaine cosmétique et employée comme un lubrifiant pour les moteurs de voitures, les peintures, utilisée aussi comme solvant pour les préparations injectables. (**Anonyme III**)

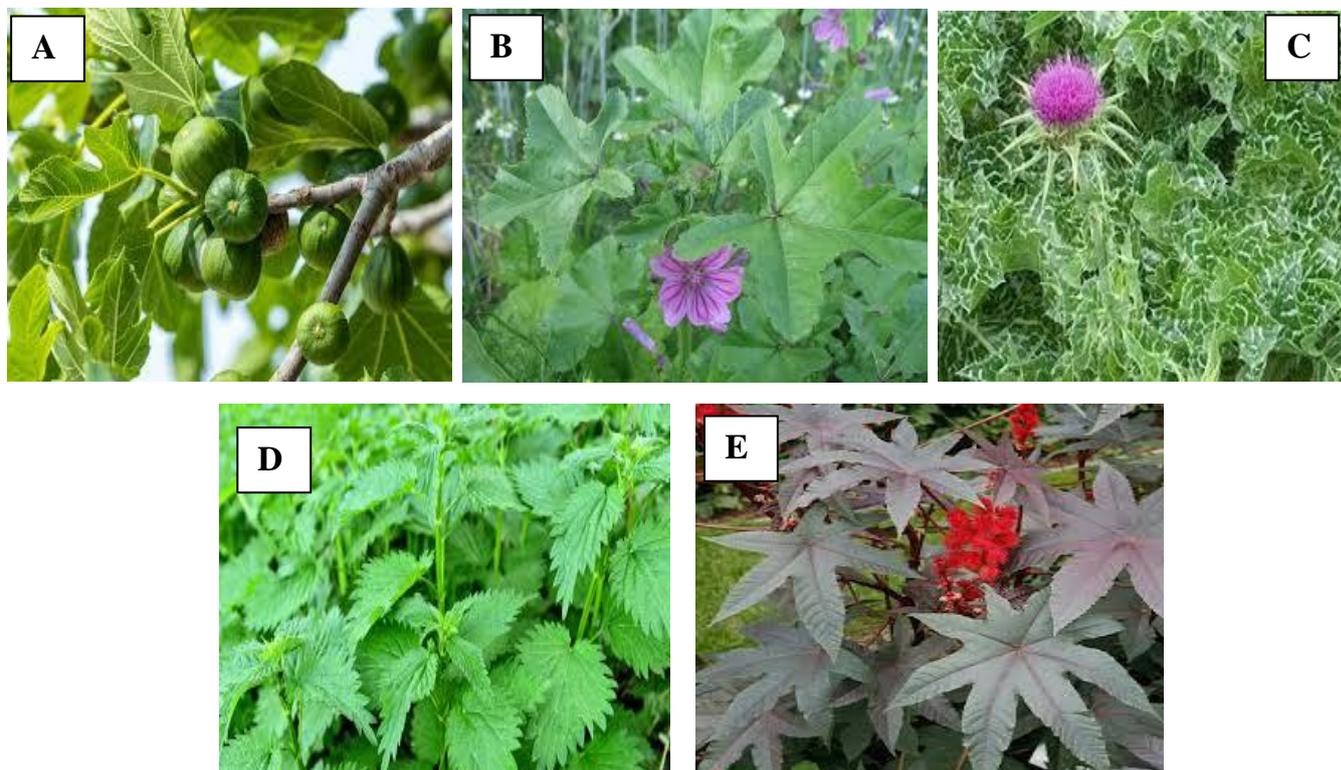
*Matériels*  
*et*  
*Méthodes*

## I. Matériels et méthodes

### I.1 Matériels végétales

Afin d'atteindre le but de cette étude, cinq succédanés de la présure, appartenant au règne végétale, ont été sélectionnés à savoir : *Silybum marianum*, *Malva sylvestris*, *Urtica dioïca*, *Riccinus communis* et *Ficus carica*.

La récolte a été faite en mois d'avril 2022 au niveau de la région Akbou pour les plantes *Silybum marianum* et *Malva sylvestris*, *Urtica dioïca*, tandis que le *Riccinus communis* a été cueilli au sein de jardinage de l'université de Bejaia. La récolte concerne la plante complète à savoir les fleurs, les feuilles et les tiges (figure 03). Ce choix dépend de la localisation de l'enzyme recherché.



**Figure 03** : photographies des succédanés d'origine végétale étudiés.

**A** : *Ficus carica*      **B** : *Malva sylvestris*      **C** : *Silybum marianum*  
**D** : *Urtica dioïca*      **E** : *Riccinus communis*

Les feuilles, fleurs et tiges récoltées subissent un séchage 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, un broyage a été effectué 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.

Dans le but de caractériser l'extrait brut coagulant du figuier *Ficus carica*, la matière première végétale utilisée est le latex, le liquide blanc visqueux qui s'échappe des feuilles, des jeunes tiges et des fruits immatures une fois séparés. Le latex a été collecté dans des flacons de 50mL, par incision manuelle de pédoncule du fruit vert immature et des feuilles, de la branche principale. Cette opération est effectuée dans les alentours du village de Mahfouda (Bejaïa), durant le mois de juin 2022.

Le latex, ainsi frais, a été transporté au laboratoire dans une glacière et immédiatement réparti dans des tubes.

Après centrifugation à 5000tr /min pendant 15 min, trois phases sont récupérées. La phase superficielle représente les gommages, et la phase inférieure représente les débris, alors que l'extrait de *ficine*, est récupéré dans la phase du milieu (**Gagaoua et al., 2014**).

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

## **I.2 Extraction et préparation des extraits enzymatiques**

### **I.2.1 Procède d'extraction de l'enzyme végétale**

L'extraction du système enzymatique à partir des poudres est réalisée selon la méthode décrite par **Lamas et al, (2001)** et **Sousa et Malcata (2002)**.

Une quantité de poudre 1.5 g est solubilisée dans un volume 30 ml de tampon phosphate (0.05M, pH 5.5). Une fois bien agité pendant 30 min, l'ensemble est laissé au réfrigérateur pendant 12h. Cette solution ainsi obtenu est filtrée, centrifugé à 1500 g pendant 20 min, et le surnageant qui représente l'extrait brut est alors récupéré pour être reparti dans des Eppendorfs 2 ml qui seront conservés au réfrigérateur.

### **I.2.2 Préparation de l'extrait enzymatique de présure**

L'extrait enzymatique industriel 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 5.25 g présure à 40 ml d'eau distillée stérile. Pour activer cette préparation enzymatique, 5 g de NaCl sont ajoutés.

### **I.3 Caractérisation physico-chimique de l'extrait brut**

Pour la caractérisation des extraits enzymatiques récupérés, diverses analyses ont été menées à savoir ; la couleur, l'aspect (la texture), le potentiel d'Hydrogène et la teneur en protéine.

La couleur et l'aspect des extraits étudiés sont déterminés selon la méthode **AFNOR (1981)**, et ceci à l'aide de la sensation de toucher et visuelle.

Le potentiel hydrogène (pH) a été déterminé selon la méthode de **AFNOR (1981)**, directement en utilisant un pH-mètre électronique, qui affiche la valeur sur son écran après avoir plongé son électrode dans un bécher contenant l'extrait enzymatique, dont la mesure est réalisée en cinq répétitions, et une moyenne est alors calculée.

#### **I.3.1 Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques**

Le dosage des protéines totales dans les extraits enzymatiques est déterminé selon la méthode de **Bradford, (1976)**, en utilisant le réactif Bradford et l'albumine de sérum bovin comme standard (**Bouazizi et al., 2022**).

La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique dont le principe repose sur l'adsorption du bleu de Comassie G250 sur les protéines (avec les acides aminés basiques tels que : Arg, Lys, His).

Une fois liée 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 présentes dans l'échantillon.

Pour 500 µl de chaque extrait enzymatique, 2 ml de réactif de Bradford sont ajoutés. Une fois bien homogénéisé au vortex, l'ensemble est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 20 min, et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 595 nm. 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) réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons (**Annexe I**).

## I.4 Mesure des activités enzymatiques

L'activité enzymatique des extraits bruts, est estimée par deux méthodes, à savoir la mesure de l'activité protéolytique et l'évaluation de l'activité coagulante.

### I.4.1 Détermination de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée selon la méthode décrite par **Green et Stackpole (1975)**. Cette mesure permet d'évaluer le taux de dégradation du substrat (caséine) par l'enzyme pendant la phase primaire (phase enzymatique). Pour cela, nous avons mesuré la concentration de produits d'hydrolyse de la caséine, solubles dans l'acide trichloracétique (TCA) à 5 % concentration finale.

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

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

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

Une unité de protéase (U) correspond à l'équivalent de 1  $\mu\text{g}$  de tyrosine libérée en une heure de digestion par 1 ml d'extrait enzymatique, avec comme substrat, soit la caséine, soit l'hémoglobine (**Mechakra et al., 1999**).

Le mélange réactionnel consiste à mélanger 1 g de caséine dans 50 mL de tampon phosphate (0.1 M, pH 7). Un volume de 1 ml 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 min, et la réaction est arrêtée par l'addition de 5 mL de TCA à 5 % puis laissée 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 100 ml de la solution A avec un volume de 2 ml 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 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) dans 50 ml d'eau distillée.

La solution B est préparée en mélangeant 0.1 g de tartrate sodium-potassium ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ ) et 50mg de sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4$  dans 10 ml d'eau distillée. Après une

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

Une fois le mélange bien agité et incubé à température de 35 °C pendant 20 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 (**AnnexeII**).

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

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

Activité spécifique= activité enzymatique (U)/teneur en protéines (mg)

#### **I.4.2 Évaluation de l'activité coagulante**

L'activité coagulante qui est exprimé par la rapidité avec laquelle l'enzyme coagule le lait, est déterminé selon la méthode de **Berridge, (1955), Libouga et al., (2006)**. Elle est basée sur l'évaluation visuelle de l'apparition des premiers flocons de la coagulation du substrat de Berridge.

Cette activité est exprimer en unité d'activité coagulante(U.A.C) ou d'unité de présure (UP) qui est définie par la quantité d'enzyme contenue dans 1ml de la solution enzymatique qui peut coaguler 10 ml de substrat standard de Berridge en 100 secondes à 35°C (**Alais, 1984 ; Ramet, 1997**)

Le substrat de Berridge est préparé par l'addition de 12 mg de lait écrémé à 100 ml de CaCl<sub>2</sub> (0.01M). Après 30 min d'agitation lente le pH est ajusté à 6,4. Afin de mesurer l'activité coagulante à 35°C, ce substrat est chauffé au bain marie jusqu'à la température voulue. Un volume de 5 ml de ce substrat (35°C) est additionnés 500µl de l'extrait enzymatique.

La mesure du temps de coagulation correspond au temps s'écoulant entre l'addition de l'extrait enzymatique au substrat de Berridge, et de l'apparition des premiers flocons de caséines visibles a l'œil nu sur la paroi interne du tube incliné, subissant un lent mouvement rotationnel.

L'activité est exprimée en unité présure (UP) et calculée d'après l'équation suivante :

$$U.P = \frac{100 * V}{10 * t * v}$$

Avec :

**UP** = unité présure ;

**V** = volume de lait (substrat de Berridge) ;

**10** = volume du substrat standard (10 mL) ;

**100** = temps de coagulation du substrat standard (100 secondes) ;

**v** = volume de l'extrait d'enzyme ;

**t** = temps de floculation en seconde.

L'activité coagulant peut être aussi exprimé sous forme de force coagulante en unités Soxhlet (**Moschopoulou, 2011**). Elle représente le nombre de volume de lait frais coagulé par un volume d'extrait coagulant, pendant un temps de 40 min à 35°C (**Alais, 1984; Benyahia-Krid et al., 2010 ; Mahaut et al., 2000**).

La force coagulante (F) est calculée selon la formule suivante :

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

Avec :

**V**: volume de lait ;

**v** : volume de l'extrait de l'enzyme ;

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

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

## **I.5 Etude des paramètres influençant l'activité enzymatique**

### **I.5.1 Effet de la température sur l'activité coagulante**

L'influence de la température sur l'activité coagulante est étudiée en mesurant l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés, à différentes températures (30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C) et en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique. Le substrat est préparé dans les mêmes conditions, à savoir une concentration en CaCl<sub>2</sub> de 0.01M, et un pH = 6,4.

### **I.5.2 Effet du potentiel d'hydrogène sur l'activité coagulante**

L'influence du potentiel hydrogène (pH) du lait sur l'activité coagulante est étudiée en mesurant l'activité coagulante des extraits enzymatiques brut des plante et la présure à température optimale pour chaque extraits enzymatiques, mais à différents pH, en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique. Le substrat de Berridge est préparé dans les mêmes conditions, à savoir une concentration en  $\text{CaCl}_2$  de 0.01M.

Le pH du lait a était ajusté pour les valeurs de : 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 ; 8 pour les extraits enzymatique brut des plantes et la présure, par l'addition des solutions de HCl (0,1N) ou de NaOH (0,1N).

La température du substrat de Berridge est ramenée à 35°C pour l'extrait enzymatique brut des plantes et pour la présure afin de mesurer le temps de coagulation qui correspond au temps s'écoulant entre l'addition de 0.5ml l'extrait enzymatique à 5ml du substrat de Berridge et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne du tube incliné subissant un lent mouvement de rotation.

### **I.5.3 Effet de la concentration en $\text{CaCl}_2$ sur l'activité coagulante**

L'influence de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  du lait sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques des plantes et la présure est étudiée à 35°C et à pH=6.4, en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique, préparé avec différentes concentrations en  $\text{CaCl}_2$  ; 0.005M, 0.01M, 0.02M, 0,03M, 0.04Met 0.05M.

Le temps de floculation est mesuré pour chaque concentration, et correspond au temps s'écoulant entre l'addition de l'extrait enzymatique au de substrat de Berridge, à la concentration en  $\text{CaCl}_2$  donnée, et de l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne du tube incliné, subissant un lent mouvement rotationnel.

### **I.5.4 Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité coagulante**

L'influence de la concentration de l'extrait enzymatique des plantes et de la présure sur l'activité coagulante est étudiée à 35°C et à PH=6.4, en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique.

L'effet de la concentration des extraits enzymatiques étudiés a été déterminé en faisant varier leurs concentrations de volume enzymatique de 250 $\mu\text{l}$  à 1750 $\mu\text{l}$  on mesurent le temps de l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne du tube incliné subissant un lent mouvement de rotation.

*Résultats*  
*et*  
*Discussions*

## II. Résultats et discussion

### II.2 Caractérisation physicochimiques des extraits étudiés

Les résultats de l'étude de la caractérisation physicochimique des extraits étudiés sont représentés dans le tableau suivant.

**Tableau II** : Caractéristiques physicochimiques des extraits enzymatiques étudiés.

L'extrait	pH	Couleur	Texture
Présure	4.5	Transparente	Liquide
Latex de <i>Ficus carica</i>	5.6	Jaune clair	Liquide
Tige <i>Malva sylvestris</i>	5.7	Brun clair	Limpide
Feuille <i>Malva sylvestris</i>	5.8	Jaune clair	Moins visqueuse
Fleur <i>Malva sylvestris</i>	5.6	Beige clair	Très visqueuse
Plane <i>Malva sylvestris</i>	5.7	Brun clair	Visqueuse
Tige <i>Urtica</i>	6.4	Vert praire	Liquide
Feuille <i>Urtica</i>	6.2	Vert foret	Limpide
Plante <i>Urtica</i>	6.2	Vert foncé	Liquide
Tige <i>Ricinuscommunis</i>	5.7	Brun clair	Liquide
Feuille <i>Ricinuscommunis</i>	5.9	Jaune clair	Limpide
Fruit <i>Ricinuscommunis</i>	5.6	Brun clair	Liquide
Plante <i>Ricinuscommunis</i>	5.8	Brun clair	Limpide
Tige <i>Silybummarianum</i>	5.8	Brun clair	Liquide
Feuille <i>Silybummarianum</i>	5.9	Jaune clair	Limpide
Fleur <i>Silybummarianum</i>	5.7	Beige clair	Liquide
Plante <i>Silybummarianum</i>	5.8	Brun clair	Limpide

Les extraits enzymatiques obtenus sont des solutions avec une couleur, un aspect, une texture et un potentiel d'hydrogène différents, qui varient d'une plante à une autre et selon la partie la plante aussi.

Le potentiel hydrogène des extraits étudiés varie de 5.6 à 6.4. L'extrait de fruit de *Ricinus communis*, l'extrait de fleur *Malva sylvestris* et l'extrait brut du *Ficus* possèdent le

potentiel d'hydrogène le plus acide, suivi respectivement par les extraits de tige et de la plante *Malva sylvestris*, ensuite l'extrait de tige de *Riccinus communis* et l'extrait de fleur *Silybum marianum* puis les extraits de feuille *Malva sylvestris*, de plante *Riccinus communis* et *Silybum marianum*, les feuilles de *Riccinus communis* et de *Silybum marianum*. Les extraits de tige et de la plante d'*Urtica* possèdent le potentiel d'hydrogène la plus basique.

La couleur des extraits étudiés, varie d'un extrait à un autre. Une couleur brune claire est observée dans les extraits de tige *Malva sylvestris*, complet *Malva sylvestris*, tige de *Riccinus communis*, fruit de *Riccinus communis*, complet de *Riccinus communis*, tige *Silybum marianum*, complet *Silybum marianum*.

Tandis qu'une couleur beige clair est caractérisée dans les extraits de fleur de *Malva sylvestris* et fleur de *Silybum marianum*.

Une couleur jaune clair est observé dans les extraits de feuilles de *Malva sylvestris*, *Riccinus communis*, *Silybum marianum* et le latex du *Ficus carica*, tandis qu'une couleur vert forêt caractérise l'extrait de feuille d'*Urtica*. Un vert foncé dans l'extrait de la plante d'*Urtica* et une couleur vert prairie dans l'extrait de tige d'*Urtica*.

Pour la texture visqueuse ; elle varie d'une texture très visqueuse caractérisant l'extrait de fleur *Malva sylvestris* à visqueuse dans l'extrait de plante de *Malva sylvestris*, et à moins visqueuse dans l'extrait de feuille *Malva sylvestris*.

Une texture limpide est observée dans les extraits ; de tige *Malva sylvestris*, de feuille d'*Urtica*, de plante de *Riccinus communis* et les extraits de feuilles et de plante du *Silybum marianum*.

Une texture liquide caractérise les extraits ; de latex du *Ficus carica*, de tige et de plante d'*Urtica*, de tige et de fruit de *Riccinus communis* et de tige et de fleur de *Silybum marianum*.

## II.2 Teneur en protéines et activités enzymatiques des extraits étudiés

Les résultats de dosage des protéines et de l'étude des activités enzymatiques des extraits étudiés sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau III** : Teneur en protéines et activités enzymatiques des extraits étudiés.

Extraits	Activité Coagulante (UP/ml)	Activité protéolytique (g/ml/min)	Dosage des protéines (mg/ml)
Présure	26.16	11.91	0.25
Latex de <i>Ficus carica</i>	0	4,94	7,85
Tige <i>Malva sylvestris</i>	1.29	3.67	0.11
Feuille <i>Malva sylvestris</i>	1.31	5.03	0.18
Fleur <i>Malva sylvestris</i>	1.16	3.54	0.26
Plante <i>Malva sylvestris</i>	2.07	3.71	0.13
Tige <i>Urtica</i>	1.60	0.62	0.15
Feuille <i>Urtica</i>	1.16	2.61	0.26
Plante <i>Urtica</i>	1.33	2.08	0.085
Tige <i>Riccinus communis</i>	1.17	2.24	0.20
Feuille <i>Riccinus communis</i>	1.14	3.71	0.26
Fruit <i>Riccinus communis</i>	1.62	2.08	0.11
plante <i>Riccinus communis</i>	1.29	4.69	0.22
Tige <i>Silybum marianum</i>	2.07	1.23	0.12
Feuille <i>Silybum marianum</i>	1.86	2.24	0.18
Fleur <i>Silybum marianum</i>	2.45	2.34	0.28
Plante <i>Silybum marianum</i>	0.21	1.95	0.26

D'après les résultats obtenus, l'activité coagulante des extraits étudiés varient de 2.45 UP/ml à 0.21UP/ml.

L'extrait de fleurs *Silybum marianum* possède l'activité coagulante la plus élevée, suivi respectivement par l'extrait de tige *Silybum marianum*, de plante *Malva sylvestris*. Tandis que l'activité coagulante la plus faible est enregistrée dans les extraits de ; plante *Silybum marianum*, feuille et tige de *Riccinus communis*, feuille *Urtica* et fleur *Malva sylvestris*.

**Dash et Ghosh(2017)** ont rapporté que Le MCA de certains extraits de plantes telles que *Actinidia deliciosa* (2,7 U/mg), *Cucumismelo* (2,3 U/mg) et les rhizomes *Zingiber officinale* (1,5 U/mg).

Selon **González-Velázquez et al.(2021)** extraits aqueux de feuilles, de fruits et de graines de *V. glabra* ont présenté différents profils protéiques, activité protéolytique et activité de coagulation du lait .

Pour latex de *ficus carica* une absence de la formation de flocons de la coagulation du substrat de Berridge a été observée, malgré qu'une activité protéolytique de l'ordre de 4,94 (ug/ml/min) soit mesurée.

D'après **Afsharnejhad et al.(2019)** qui ont rapporté une activité coagulante de 21.88 (U/ml) et une activité protéolytique de  $0,519 \pm 0,01$  (UI/ml).

Selon **Raskovic et al.(2015)** la concentration de protéine du latex augmente par ordre chronologique du temps passant de 16 mg/ml en mois de mai à 41mg/ml en mois d'aout, et d'après les résultats qu'ils ont obtenus avec la coagulation du lait ont montré que l'activité spécifique de coagulation du lait augmentait, tout comme l'abondance des bandes de caséine dans les caillots.

D'après **Aider (2021)**, il semble nécessaire de séparer la ficine des autres enzymes contenues dans le latex pour améliorer son efficacité pour la coagulation du lait et de collecter le latex lorsque la teneur en *Ficine* est la plus élevée.

Selon **Bouazizi et al.(2022)** une bonne présure végétale se caractérise par une forte activité de coagulation du lait sur la  $\kappa$ -caséine et une faible activité protéolytique, on a sélectionné quatre (4) extraits sur lesquels on a poursuivi les analyses des effets (effets de température, effet du pH, effet de concentration  $CaCl_2$ , et volume de l'extrait) ses extraits sont : plante *Malva sylvestris*, tige d'*Urtica*, fruit *Riccinus communis*, fleur *Silybum marianum*.

### II.2.1 Activité coagulante

Les résultats de la présente étude (**tableau III**) montrent que l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés est de 26.16 UP/ml pour la présure et 2.07 UP/ml pour l'extrait de complet de *Malva sylvestris*, 1.60 UP/ml pour l'extrait tige d'*Urtica*, comparant celle qui est retrouvée par **Bouazizi et al.(2022)** Le MCA a atteint la valeur minimale à une plage de pH de 4,5 à 5,5. L'extrait enzymatique de feuilles d'ortie préparé à pH = 6,5 a présenté une MCA plus faible (0,014 U/mL). 1.62 UP/ml pour l'extrait fruit de *Riccinus communis*, 2.45 UP/ml pour

l'extrait fleur de *Silybum marianum*. L'extrait enzymatique présure présente l'activité la plus élevée par rapport à les extraits végétales **Alavi et Momen. (2020)** ont rapporté que *Cynara cardunculus* les fleurs ayant l'activité de coagulation du lait la plus élevée.

### II.2.2 Activité protéolytique

L'activité protéolytique est basée sur l'estimation de la quantité des peptides simples et des acides aminés libres formés par l'hydrolyse d'une protéine sous l'action d'une protéase ou un mélange de protéases.

Les résultats (**tableau III**) de l'estimation de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques étudiés indiquent que l'activité protéolytique de la solution présure est plus élevée que celle des extraits végétales comme on a trouvé que chaque partie de plante as une activité protéolytique spécifiques.

Les résultats du (**tableau III**) montrent que l'activité protéolytique de la présure estimée à 11.91 µg/ml/min de protéines est six fois supérieure à celle des extraits brut végétales estimée à 2.08 µg/ml/min de protéines pour l'extrait fruit de *Riccinus communis*, et 2.34 µg/ml/min de protéines pour l'extrait fleur de *Silybum marianum*, tandis que **Alavi et Moumen(2020)** a trouvé que l'activité protéolytique des PA du chardon est supérieure à celle de la chymosine, 3.71 µg/ml/min de protéines pour l'extrait *Malva sylvestris* complet et de 0.62µg/ml/min pour l'extrait tige d'*Urtica*. Alors que **Grozdanovic et al. (2013)** ont retrouvé que l'extrait de *Kiwi* à pH 5,0 (0,46 mg/ml).

L'activité protéolytique spécifique élevée de la présure est due à sa pureté élevée (100% chymosine), contrairement à les extraits bruts des plantes (*Silybum marianum*, *Urtica*, *Malva sylvestris*, *Riccinus communis*) qui contient des protéines enzymatiques et également des protéines non enzymatiques.

### II.2.3 Dosage des protéines

Les résultats de la présente étude montrent que la teneur en protéine des extraits enzymatique étudiés varie de 0.28 mg/ml pour l'extrait fleur *Silybum marianum*, suivi par les extraits : fleur *Malva sylvestris*, feuille *Urtica*, feuille *Riccinus communis*, complet *Silybum marianum* avec un dosage de 0.26mg/ml, et un dosage de 0.20mg/ml pour l'extrait tige *Riccinus communis* puis 0.18mg/ml pour l'extrait de feuilles *Malva sylvestris* et du *Silybum marianum*, Un dosage de 0.15 mg/ml pour l'extrait tige *Urtica* alors que **Bouazizi et al.(2022)**

ont trouvé que Les extraits enzymatiques de feuilles d'ortie présentaient une teneur en protéines comprise entre  $0,68 \pm 0,00$  mg/mL et  $3,77 \pm 0,01$  mg/mL. La valeur optimale de la teneur en protéines a été détectée à pH = 5,5 et pH = 6 ( $3,71 \pm 0,01$  et  $3,77 \pm 0,01$  mg/mL, respectivement) cette différence pourraient être attribuer à la partie dont on as extrait l'enzyme, et 0.11 mg/ml pour les extraits fruit *Riccinus communis*, tige *Malva sylvestris* suivit progressivement par l'extrait de tige *Silybum marianum* avec un dosage de 0.13 mg/ml puis l'extrait de tige *Silybum marianum* avec un dosage de 0.12mg/ml et 0.11 mg/ml pour les extraits fruit *Riccinus communis*, tige *Malva sylvestris* et en dernier on peut classer l'extrait de complet *Urtica* avec un dosage de 0.085mg/ml.

**Bouazizi et al.(2022)** ont rapporté que les différences observées dans la teneur en protéines des extraits préparés à différentes valeurs de pH pourraient être attribuées aux caractéristiques d'extraction du tampon utilisé. Pour l'extrait de fruit *Riccinus communis* la teneur en protéine la plus élevée est retrouvée dans l'extrait brut de la fleur *Silybum marianum* ensuite celle de l'extrait présure.

### **II.3 Détermination des conditions optimales de coagulation des extraits enzymatiques étudiés**

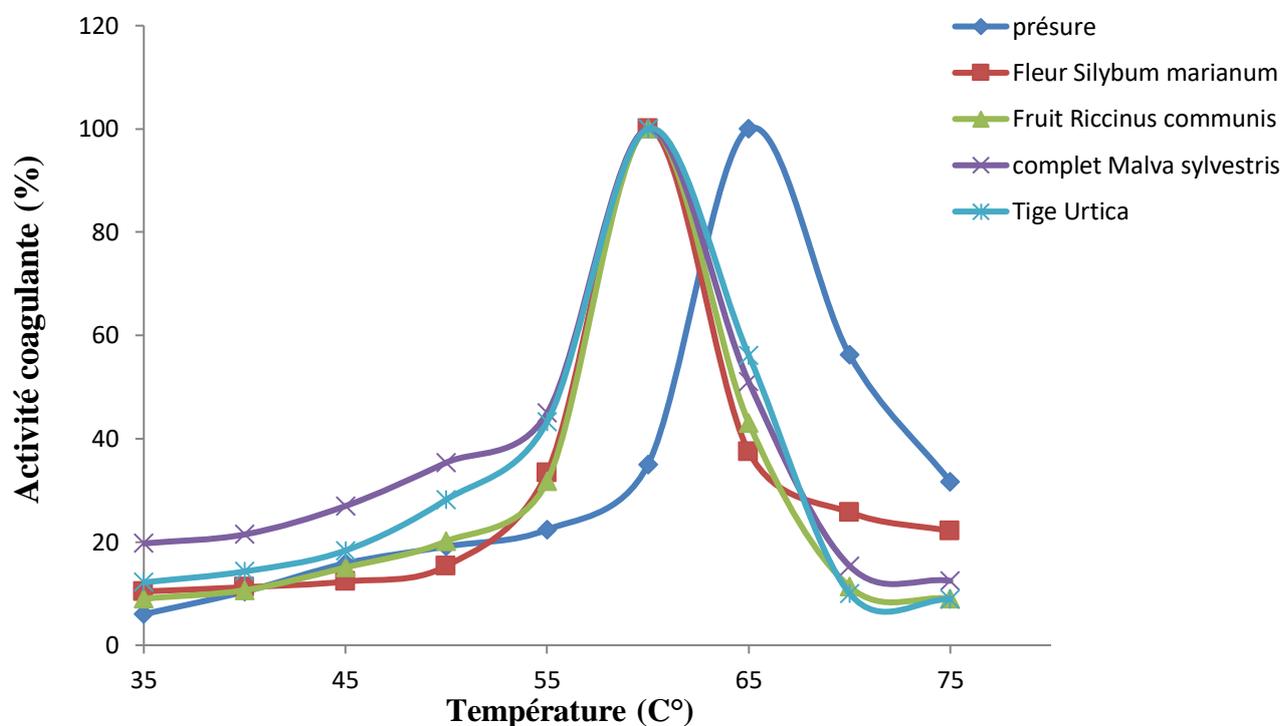
#### **II.3.1 Effet de la température sur l'activité des extraits étudiés**

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**).

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 (**Özer et al., 2010; Kumar et al., 2012; Bayraktar et Önal, 2013**).

De ce fait, une étude de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatique étudiés a été réalisée. La variation de l'activité des extraits enzymatique est suivie en fonction de la température, de 35 à 70°C.

Les résultats obtenus, de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés sont représentés dans la **figure 04**.



**Figure 04:** Représentation graphique de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

Les résultats obtenus de la présente étude, montrent que l'activité enzymatique des cinq extraits est très influencée par la température. Cette activité augmente avec l'augmentation de la température, jusqu'à un certain seuil, puis elle décroît.

Pour l'extrait de fleur *Silybum marianum* l'activité passe de 10,41% UP à température de 35°C et atteint son optimum aux valeurs proches de 100% à 60°C et décroît à 65°C.

Pour l'extrait de fruit *Riccinus communis* l'activité passe de 9,02 % à température de 35°C et atteint son optimum aux valeurs proches de 100 % à 60°C et décroît a 65°C.

Pour l'extrait de *Malva sylvestris*complet l'activité passe de 19,71 % à température de 35°C et atteint son optimum aux valeurs proche de 100% à 60°C et décroît a 65°C.

Pour l'extrait de tige *Urtica* l'activité passe de 12,16% UP à température de 35°C et atteint son optimum aux valeurs proches de 100% à 60°C et décroît à 65°C.

Pour l'extrait de la présure l'activité passe de 6% UP à température de 35°C et atteint son optimum aux valeurs proches de 100% à 65°C et décroît à 70°C.

Ce résultat est très similaire à celui rapporté par plusieurs auteurs (**Afsharnejhad et al., 2019**), qui ont rapportés que les températures optimales pour les protéases de *Zingiber officinale* et *Capparis spinosa* est de 60°C.

Selon **Bayraktar et Önal (2013)**, la température optimale de l' $\alpha$ -galactosidase de pastèque s'est avérée être de 60°C.

**Gagaoua et al., (2014)**, ont retrouvés que la température optimale de la *Ficine* fractionnée s'est avérée être de 60°C.

Le profil de température a montré que l'activité de la protéase (extrait à partir de graines germées de *Moringa oleifera*) augmentait de manière significative avec l'élévation de la température et atteignait la valeur maximale de l'activité spécifique de coagulation du lait à 60°C (**Wang et al., 2021**), qui est la même que la température optimale pour la protéase purifiée à partir de graines sèches de *Moringa oleifera*, cependant, l'activité a diminué avec une augmentation supplémentaire de la température (**Wang et al., 2020**).

Selon **Bey et al. (2018)**, l'activité coagulante de l'extrait brut des parties non comestibles du *fenouil* atteint la valeur maximale à la température de 60°C, et diminue à 65°C.

Les mêmes résultats ont également été rapportés pour l'activité de coagulation du lait par **Zikiou et Zidoune (2019)**, qui ont montré l'activité de coagulation du lait des extraits de fleurs de *Cynara cardunculus* renforcée avec l'augmentation de la température avec un pic à 60°C ; cependant, à des températures plus élevées, l'activité a diminué, ce qui montre une dénaturation enzymatique (**Alavi et Momen, 2020**).

La température est l'un des paramètres importants qui affectent l'activité de l'enzyme. La vitesse de réaction augmente avec l'augmentation de la température. Mais après une certaine température, l'activité est diminuée en raison de la dénaturation de la protéine enzymatique (**Bayraktar et Önal, 2013**).

### II.3.2 Effet du pH sur l'activité coagulante des extraits bruts étudiant

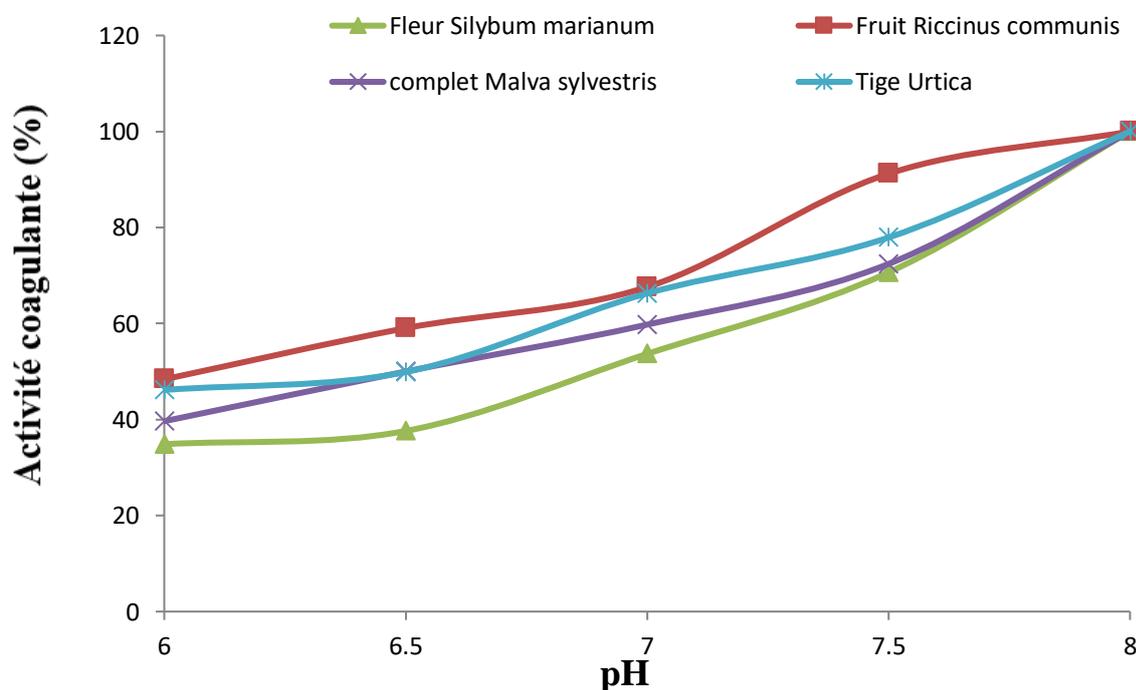
Le pH influence le fonctionnement des enzymes. De ce fait, il existe un pH optimal, autour duquel l'enzyme fonctionnera le mieux et sera plus efficace. Ce pH optimal, propre à

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.

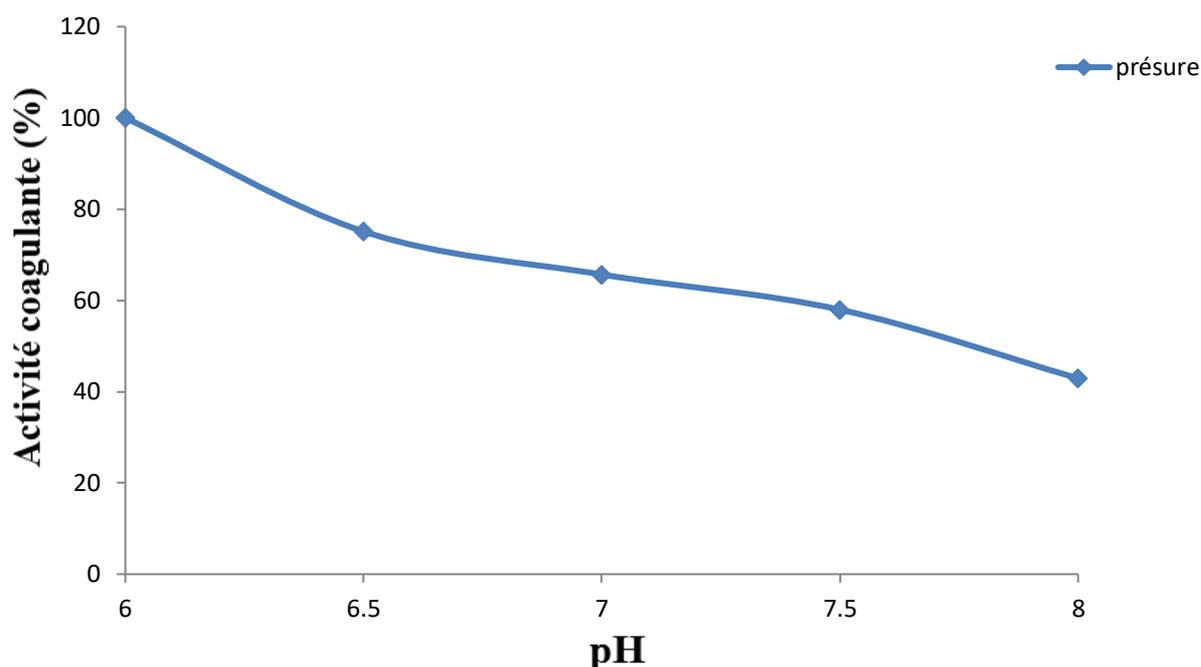
En effet, l'acidité du milieu peut déformer la structure tertiaire d'une enzyme de façon plus ou moins importante. Cette déformation de l'enzyme modifie son action, et ne fonctionne plus normalement et sa vitesse catalytique est réduite (Robitaille et al., 2012).

L'effet du pH sur l'activité coagulante des cinq extraits enzymatiques a été étudié en ajustant le pH du lait aux valeurs situées dans l'intervalle de 6 à 8. La température d'incubation est fixée à 35°C. Le pH optimum de coagulation du lait est déterminé en observant le temps de floculation le plus court.

Les résultats obtenus, de l'effet du pH sur l'activité coagulante des cinq extraits enzymatiques et de la présure sont représentés dans la **figure 05** et la **figure 06**.



**Figure 05** : Représentation graphique de l'influence du pH sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.



**Figure 06 :** Représentation graphique de l'influence du pH sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique de présure.

Les résultats obtenus dans la présente étude, montrent que l'activité enzymatique des cinq extraits enzymatiques est très influencée par le pH. Cette activité augmente avec l'augmentation du pH, jusqu'à un certain seuil, puis elle décroît. En effet :

Pour l'extrait de fleur *Silybum marianum* l'activité coagulante, augmente progressivement avec l'augmentation du pH. Elle est de l'ordre de 34.86% à la valeur du pH 6, et atteint le 100% au voisinage du pH 8.

Pour l'extrait de fruit *Ricinus communis* l'activité coagulante, augmente progressivement avec l'augmentation du pH. Elle est de l'ordre de 48.38% à la valeur du pH 6, et atteint le 100% au voisinage du pH 8.

Pour l'extrait de *Malva sylvestris* complet l'activité coagulante, augmente progressivement avec l'augmentation du pH. Elle est de l'ordre de 39.65% à la valeur du pH 6, et atteint le 100% au voisinage du pH 8.

Pour l'extrait de tige *Urtica* l'activité coagulante, augmente progressivement avec l'augmentation du pH. Elle est de l'ordre de 46.15% à la valeur du pH 6, et atteint le 100% au voisinage du pH 8.

Les résultats obtenus montrent, également, que l'activité coagulante de l'extrait enzymatique de la présure, augmente au fur et à mesure de l'abaissement du pH du lait. L'activité la plus élevée est observée à pH= 6, et diminue de 60% à pH =8.

Le pH du milieu est très important pour une meilleure récupération et activité de la protéase ciblée. En effet, cela affecterait la concentration en protéines d'une manière dépendante du pH en raison des interactions électrostatiques entre les phases et les résidus chargés de la protéine (**Hafid et al.,2020** ).

Selon **Gagaoua et al. (2014)**, l'activité maximale de la *Ficine* purifiée a été observée entre pH 6,0 et 7,5 et a montré un optimum à pH 6,5.

Selon **Gagaoua et al. (2015)**, l'activité maximale de la *zingibaine* a été observée entre pH 6,0 et 7,5 et a montré un optimum à pH 7,0.

Ces résultats ont confirmé que l'enzyme est instable à pH acide et que l'enzyme est plus stable à pH 6,0–7,0

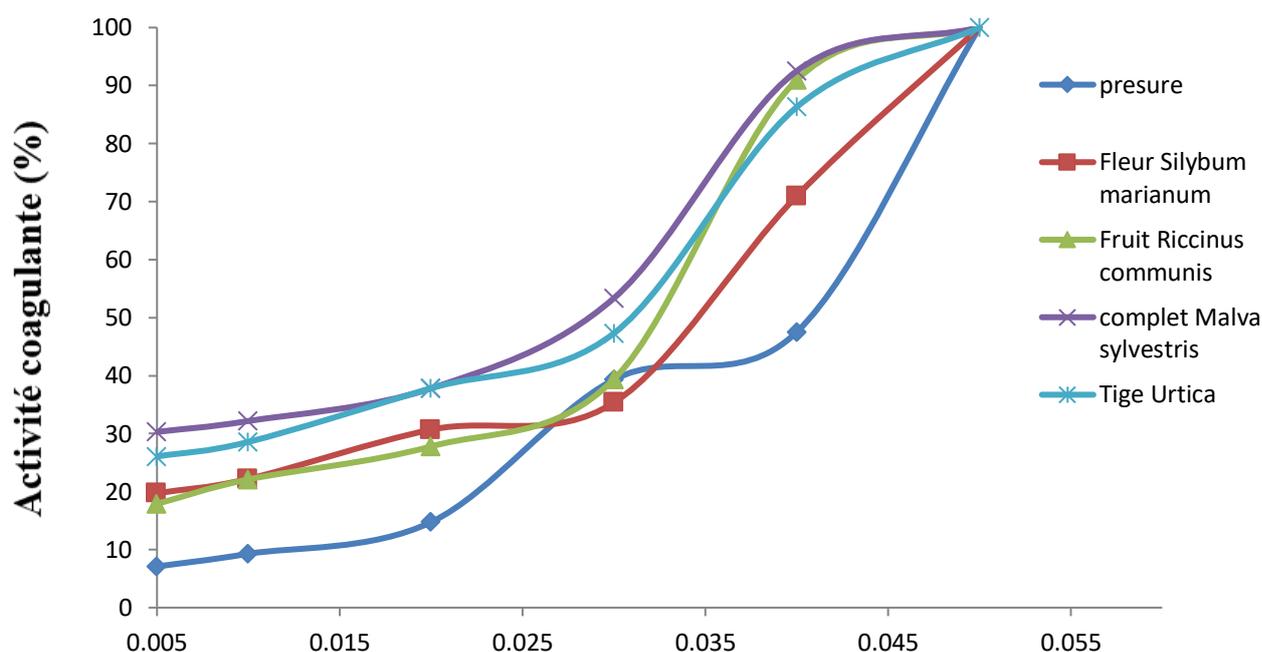
Le changement de pH affecte à la fois la réaction enzymatique et d'agrégation; bien que l'effet du pH sur la phase enzymatique soit mineur par rapport à ses effets sur l'agrégation. En effet, l'acidification diminue la stabilité des micelles de caséine par la neutralisation de leurs charges négatives. Lorsque le pH passe de 5,8 à 5,5, les micelles ont tendance à se rapprocher du fait de la diminution de leur potentiel. A un pH d'environ 6,8, la  $\beta$ -lactoglobuline s'associe à la caséine kappa par des ponts disulfure. A un pH inférieur à 6,5, l'association se faisait par des liaisons hydrophobes. Récemment, **Ye et Harte(2013)** ont prouvé qu'à un pH > 8, la structure des micelles de caséine était relâchée et dissociée (**Bey et al., 2018**).

### II.3.3 Effet de la concentration de $\text{CaCl}_2$ sur l'activité des extraits bruts étudiés

L'hydrolyse de la caséine  $\alpha_{s1}$  par les enzymes de coagulation du lait est fortement influencée par la concentration de NaCl et de solutés similaires tels que  $\text{CaCl}_2$  qui est principalement liée aux changements conformationnels de la structure de la caséine (**Afsharnejhad et al., 2019**)

L'effet de la concentration du  $\text{CaCl}_2$  du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la pepsine végétale a été étudié en variant la concentration du  $\text{CaCl}_2$  du lait (substrat de Berridge) aux valeurs de 0,005 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 et 0,05 M

Les résultats obtenus, de l'effet de la concentration de  $\text{CaCl}_2$ , sur l'activité coagulante des extraits végétaux bruts et de la présure sont représentés dans la **figure 07**.



**Figure 07:** Représentation graphique de l'influence de la concentration du  $\text{CaCl}_2$  sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

Les résultats obtenus, de la présente étude, montrent que l'activité coagulante des extraits augmente avec l'augmentation de la concentration de  $\text{CaCl}_2$ , dont l'activité, la plus élevée est observée à la concentration de 0,05M pour les extraits enzymatiques étudiés.

Pour l'extrait de fleur *Silybum marianum* l'activité passe de 19,72% UP a la concentration 0,005 et atteint son optimal aux valeurs proche 0,05 à 100%.

Pour l'extrait de fruit *Ricinus communis* l'activité passe de 30,29% a concentration 0,005 et atteint son optimale aux valeurs proche 0,05 à 100 %.

Pour l'extrait de *Malva sylvestris* complet l'activité passe de 30,29% a concentration 0,005 et atteins son optimale aux valeurs proche 0,05 à 100%.

Pour l'extrait de tige *Urtica* l'activité passe de 26,06 % a concentration 0,005 et atteins son optimale aux valeurs proche 0,05 à 100%.

Pour l'extrait de présure l'activité passe de 7,09 % a concentration 0,005 et atteint son optimale aux valeurs proche 0,05 à 100%.

En accord avec **Hafid et al. (2020)** l'ajout de  $\text{CaCl}_2$  a fortement diminué le temps de coagulation du lait. La concentration optimale pour l'activité de la coagulation du lait était de 40 à 50 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

L'ajout de chlorure de calcium au lait, actuellement utilisé dans l'industrie laitière, a pour effet de réduire le temps de coagulation et d'augmenter la fermeté du coagulum (**Hafid et al., 2020**). Cependant, un ajout excessif de  $\text{CaCl}_2$  peut réduire la synérèse (**Arbita et al., 2020**).

La concentration de  $\text{CaCl}_2$  a eu un fort impact sur l'activité de coagulation du lait de l'extrait purifié de la protéase de *G.edulis*, et l'activité la plus élevée s'est produite à la concentration de 50 mM (**Arbita et al., 2020**).

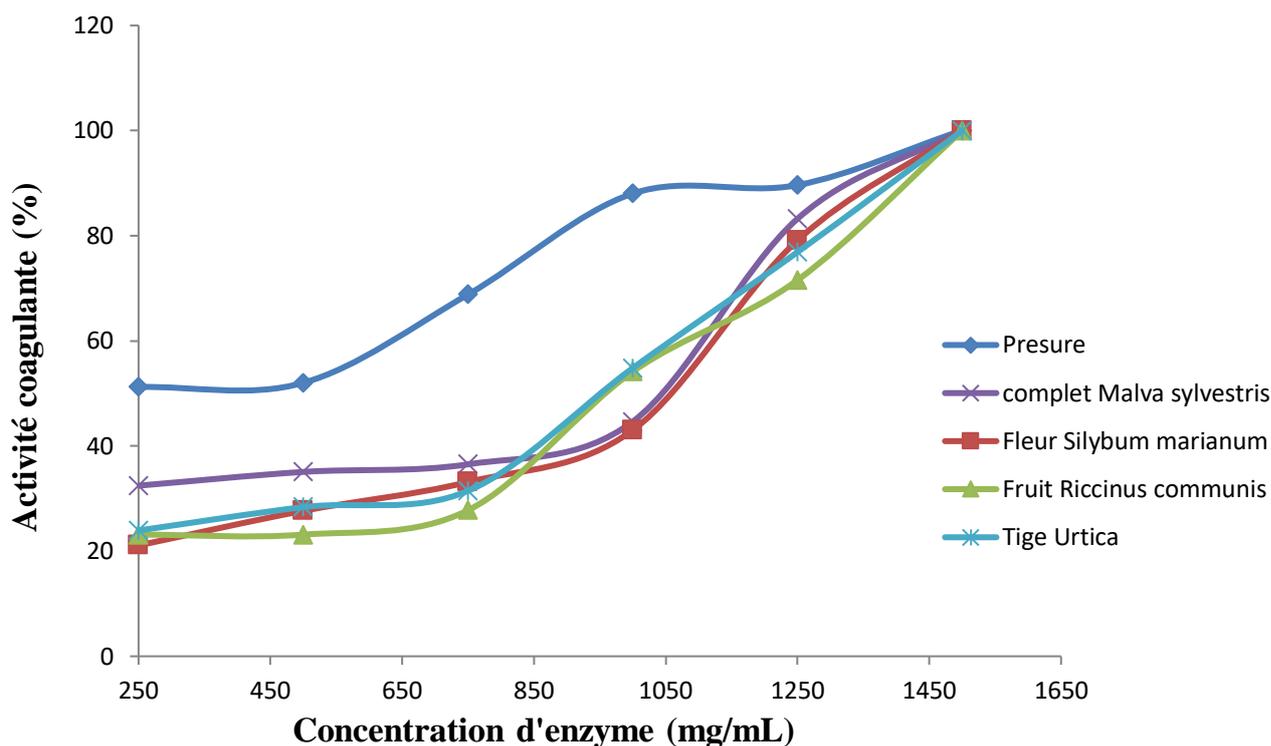
À des concentrations élevées de  $\text{CaCl}_2$  (plus de 250 mM), la coagulation ne s'est pas non plus produite, probablement parce que trop d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  étaient dans un état ionique libre qui inhibait la gélification (**Arbita et al., 2020**).

A des concentrations suffisantes, le calcium aide à la coagulation en créant des conditions isoélectriques et en agissant comme un pont entre les micelles de caséine. Au cours de l'étape non enzymatique de la coagulation du lait (deuxième étape), le calcium a une influence importante sur l'agrégation de la caséine. Les complexes de calcium et de calcium-phosphate neutralisent les résidus négatifs des micelles de caséine (groupes phosphosérine et carboxylique) c'est pourquoi une augmentation de sa concentration entraîne une augmentation du taux de coagulation (**Bey et al., 2018**).

#### **II.3.4 Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante des extraits bruts**

L'effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité enzymatique coagulante des extraits enzymatiques étudiés est déterminé par l'évaluation de l'activité coagulante à différentes concentrations de l'enzyme à savoir : 10, 20, 30, 40, 50 et 60 mg/ml.

Les résultats obtenus, de l'effet de la concentration de l'enzyme, sur l'activité des extraits enzymatique étudiés, sont représentés dans la **figure 08**.



**Figure 08:** représentation graphique de l'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

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 cinq extraits enzymatiques.

L'activité coagulante la plus faible est enregistrée à la concentration de l'enzyme de l'ordre de 250 $\mu$ l, qui est estimée à 21.09% pour l'extrait de Fleur *Silybum marianum*, 23.14% pour l'extrait de Fruit *Riccinus communis*, 32.46% pour l'extrait de *Malva sylvestris* complet, 23.93% pour l'extrait de Tige *Urtica* et 51.22 pour la présure.

Cette activité augmente avec une allure plus importante, pour les cinq extraits étudiés 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 1500 $\mu$ l de l'enzyme).

**Bey et al. (2018)**, ont rapportés que **Van Hooydonk et Walstra (1987)** ont considéré le temps de coagulation comme une fonction de la concentration en enzyme réciproque. D'autre part, plusieurs modèles ont été proposés pour la coagulation du lait qui corrént le temps de coagulation avec la concentration enzymatique (**Payens et al., 1977**), le temps de coagulation réciproque avec la concentration enzymatique (**Kopelman et Cogan., 1976**) et le temps de coagulation avec la racine carrée réciproque de la concentration enzymatique (**Hyslop et al., 1979**).

***Conclusion***

### Conclusion

Ce travail a été entrepris afin d'étudier la possibilité de remplacer la présure (d'origine animale) par des extraits brutes végétales (Latex du *Ficus*, *Urtica*, *Malva sylvestris*, *Riccinus communis*).

Le but de cette étude était principalement de caractériser les coagulants. Notre démarche s'est déroulée en deux phases. Premièrement, la récupération d'une matière première d'origine végétale contenant le système enzymatique d'intérêt, l'extraction d'un extrait enzymatique brut à partir de différentes parties des plantes, deuxièmement la caractérisation des extraits en ce qui concerne le dosage des protéines, l'activité coagulante, et l'activité protéolytique et l'optimisation des conditions d'activité coagulante (température, valeur du pH, concentration en  $\text{CaCl}_2$  et concentration en enzyme).

Des extraits enzymatiques de Latex du *Ficus*, *Urtica*, *Malva sylvestris*, *Riccinus communis*, *Silybum marianum* ont été récupérés et les résultats de leur caractérisation ont permis de constater que :

- Le latex du *Ficus* possède une activité protéolytique de 4.94  $\mu\text{g/ml/min}$ , mais une très faible activité coagulante ce qui pourrait être attribué à la période de la récolte ou la variété.
- L'extrait d'*Urtica* a une activité coagulante de 1.60 UP/ml, et une activité protéolytique de 0.62  $\mu\text{g/ml/min}$ .
- L'extrait de *Malva sylvestris* a une activité coagulante de 2.07 UP/ml, et une activité protéolytique de 3.71  $\mu\text{g/ml/min}$ .
- L'extrait de *Riccinus communis* a une activité coagulante de 1.62 UP/ml, et une activité protéolytique de 2.08  $\mu\text{g/ml/min}$ .
- L'extrait de *Silybum marianum* a une activité coagulante de 2.45 UP/ml, et une activité protéolytique de 2.34  $\mu\text{g/ml/min}$ .

L'étude des conditions optimales d'activité a montré des différences de comportement entre les cinq extraits enzymatiques. Le pH optimal de coagulation pour les extraits (fleur *Silybum marianum*, fruit *Riccinus communis*, *Malva sylvestris* complet et tige d'*Urtica*) est dans le domaine neutre évalué à 8 contrairement à celui de la présure évalué à 6.

## *Conclusion*

---

Pour la température optimale de coagulation, les résultats obtenus révèlent une différence de comportement entre les cinq extraits enzymatiques. En effet, l'optimum d'activité pour les extraits (fleur *Silybum marianu*, fruit *Riccinus communis*, *Malva sylvestris* et tige d'*Urtica*) est obtenu à une température de 60°C et la présure à 65°C.

Concernant l'étude de l'influence de la concentration en chlorure de calcium, les résultats obtenus ont montré que l'optimum de l'activité coagulante des extraits étudiés (fleur *Silybum marianu*, fruit *Riccinus communis*, *Malva sylvestris* et tige d'*Urtica*), ainsi que l'extrait de la présure est de 0,05 M.

Pour conclure, 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 en partant des pratiques traditionnelles. Ces extraits sont obtenus à partir de matières assez disponibles et inexploitées. Cependant il est intéressant de compléter cette étude par :

- L'étude des paramètres affectant l'extraction de ces enzymes afin d'améliorer la qualité et le taux d'extraction des extraits ;
- Purifier ces extraits bruts et étudier leurs différentes fractions protéiques afin de sélectionner celle qui possède les meilleures performances coagulantes
- La possibilité d'utiliser des extraits étudiés dans la fabrication de différents types du fromage ;

*Références  
bibliographiques*

## Liste des références bibliographique

---

### A

Afsharnezhad, M., Shahangian, S. S., & Sariri, R. (2019). A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: Purification and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 173-182.

AFNOR, E. (1981). Association National des normalisations. Guide général pour la sélection, l'entraînement et le contrôle des sujets

Aider, M. (2021). Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates. *JDS Communications*, 2(5), 233-237.

Alais, C. (1984). Principes des techniques laitières. *Science du Lait*, 196, 197.

Alavi, F., & Momen, S. (2020). Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. *International Dairy Journal*, 107, 104709.

AMIMOUR, M. : Essais d'optimisation des procédés de fabrication des fromages traditionnels de qualité (jben et klila) (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).

Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P., & Simpson, R. (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. *Science et technologie du lait*, 1-74.

Arbita, A. A., Paul, N. A., Cox, J., & Zhao, J. (2020). Extraction, partial purification and characterization of proteases from the red seaweed *Gracilaria edulis* with similar cleavage sites on  $\kappa$ -casein as calf rennet. *Food chemistry*, 330, 127324.

### B

Bayraktar, H., & Önal, S. (2013). Concentration and purification of  $\alpha$ -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning. *Separation and purification technology*, 118, 835-841.

## Liste des références bibliographique

---

Ben Amira, A., Besbes, S., Attia, H., & Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S76-S93.

Benkahoul, M., & Mechakra-Maza, A. (2016). Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité coagulante des protéases de deux chardons endémiques, *Galactites tomentosa* et *Onopordum acanthium* (Doctoral dissertation, Université des frères mentouri constantine).

Benyahia-Krid, F. A., Attia, H., & Zidoune, M. N. (2010). Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: interactions and microstructure. *Journal of Agriculture, Biotechnology and Ecology*, 3(1), 75-86.

Berridge N.J. (1955) Purification and assay of rennin. *Methods in enzymology*. Ed. Perlmann G.E. and Loran Acad. Press Inc., New York. Vol. 2. 69-77

Bey, N., Debbebi, H., Abidi, F., Marzouki, M. N., & Salah, A. B. (2018). The non-edible parts of fennel (*Foeniculum vulgare*) as a new milk-clotting protease source. *Industrial crops and products*, 112, 181-187.

Bouacherine, M., & Ouchene, Z. (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 (Doctoral dissertation, Université de Bouira).

Bouazizi, A., Felfoul, I., Attia, H., & Karoui, R. (2022). Characterization of nettle leaves (*Urtica dioica*) as a novel source of protease for clotting dromedary milk by non-destructive methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 211, 112312.

Boughellout, H. (2007). Coagulation du lait par la pepsine du poulet. Mémoire magister, université Mentouri constantine, 69p.

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*. 72. 248-254.

## Liste des références bibliographique

---

Britten, M., & Giroux, H. J. (2022). Rennet coagulation of heated milk: A review. *International Dairy Journal*, 124, 105179.

### D

Dash, P., & Ghosh, G. (2017). Proteolytic and antioxidant activity of protein fractions of seeds of *Cucurbita moschata*. *Food bioscience*, 18, 1-8.

De Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S., & Petukhov, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in colloid and interface science*, 171, 36-52.

Delahaye, J. (2015). Utilisations de l'ortie-*Urtica dioïca* L.

Dussault-Chouinard, I. (2019). Amélioration des performances fromagères des concentrés laitiers d'osmose inverse: phase de coagulation par la présure.

### E

Eleya, M. E. M. O. (1996). Analyse de la formation des gels acides de laits de vache, de chèvre et de brebis au moyen de la géométrie fractale: étude comparative (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine).

### F

Ferraguena AZ, Boudelioua A (2018). Contribution phytochimique et évaluation in vitro et in vivo des activités biologiques de la plante *Urtica dioïca* L, mémoire master, Université des Frères Mentouri Constantine

Fox, P. F., Singh, T. K., & McSweeney, P. L. H. (1994). Proteolysis in cheese during ripening. *Special Publication-Royal Society of Chemistry*, 150, 1-1.

### G

Gagaoua M, Boucherba N, Bouanane-Darenfed A, Ziane F, Nait-Rabah S, Hafid K, Boudechicha H-R (2014) Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. *Sept. Purif. Technol* 132:461-467.

Gagaoua, M., Hoggas, N., & Hafid, K. (2015). Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale* Roscoe rhizomes. *International journal of biological macromolecules*, 73, 245-252.

## Liste des références bibliographique

---

Gomes, S., Belo, AT, Alvarenga, N., Dias, J., Lage, P., Pinheiro, C., ... & Martins, AP (2019). Caractérisation de la fleur de *Cynara cardunculus* L. de l'Alentejo comme agent coagulant pour la fabrication du fromage. *Journal laitier international*, 91, 178-184.

González-Velázquez, D. A., Mazorra-Manzano, M. A., Martínez-Porchas, M., Huerta-Ocampo, J. A., Vallejo-Córdoba, B., Mora-Cortes, W. G., ... & Ramírez-Suarez, J. C. (2021). Exploring the milk-clotting and proteolytic activities in different tissues of *Vallesia glabra*: a new source of plant proteolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(2), 389-404.

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

Grozdanovic, M. M., Burazer, L., & Gavrovic-Jankulovic, M. (2013). Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. *International Dairy Journal*, 32(1), 46-52.

### H

Hafid, K., John, J., Sayah, T. M., Domínguez, R., Becila, S., Lamri, M., ... & Gagaoua, M. (2020). One-step recovery of latex papain from *Carica papaya* using three phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent. *International journal of biological macromolecules*, 146, 798-810.

Hyslop, D. B., Richardson, T., & Ryan, D. S. (1979). Kinetics of pepsin-initiated coagulation of  $\kappa$ -casein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 566(2), 390-396.

### J

Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.). Lavoisier.

Jeanet, R., Croguennec, T., Garric, G., & Brulé, G. (2017). *Initiation à la technologie laitière*.

### K

## Liste des références bibliographique

---

Kim, Y. S., Park, S. J., Lee, E. J., Cerbo, R. M., Lee, S. M., Ryu, C. H., ... & Ha, Y. L. (2008). Antibacterial compounds from rose Bengal-sensitized photooxidation of  $\beta$ -caryophyllene. *Journal of food science*, 73(7), C540-C545.

Kopelman, I. J., & Cogan, U. (1976). Determination of clotting power of milk clotting enzymes. *Journal of Dairy Science*, 59(2), 196-199.

Krid, N. B. F. A.(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.

Kumar VV, Sathyaselvabala V, Premkumar M, Vidyadevi T and Sivanesan S (2012) Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74:63-72.

Kumar, A., Sharma, J., Mohanty, A. K., Grover, S., & Batish, V. K. (2006). Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 145(1), 108-113.

### L

Lamas, E. M., Barros, R. M., Balcão, V. M., & Malcata, F. X. (2001). Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(7-8), 642-652.

Lansky, E. P., Paavilainen, H. M., Pawlus, A. D., & Newman, R. A. (2008). *Ficus* spp.(fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(2), 195-213.

Lapointe-Vignola, C. (2002). *Science et technologie du lait: transformation du lait*. Presses inter Polytechnique.

Libouga, D. G., Vercaigne-Marko, D., Djangal, S. L., Choukambou, I., Ebangi, A. L., Ombionyo, M., ... & Guillochon, D. (2006). Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*. *Tropicult*, 24(4), 229-238.

## Liste des références bibliographique

---

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.

### M

Mahaut, M., Jeantet, R., & Brulé, G. (2000). *Initiation à la technologie fromagère*. Editions Tec & Doc.

Mawa, S., Husain, K., & Jantan, I. (2013). *Ficus carica L.(Moraceae): phytochemistry, traditional uses and biological activities*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

Mechakra, A., Auberger, B., Remeuf, F., & Lenoir, J. (1999). Optimization of a culture medium for acid proteolytic enzyme production by *Penicillium camemberti*. *Sciences des aliments*, 19(6), 663-676.

Mekhaneg, B. (2020). *Variation de la composition du lait en fonction de la race et de l'alimentation* (Doctoral dissertation).

Moschopoulou, E. (2011). Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 188-195.

### N

Nicotra, G., Vicentini, S., & Mazzolari, A. (2010). *Ficus carica*. *Nutrafoods*, 9(3), 27-30.

Nouani, A. (2009). *Recherche de succédanés de la présure traditionnelle utilisés dans la coagulation du lait* (Doctoral dissertation)

### O

ONS, (2012)., Office National des Statistiques.

Özer, B., Akardere, E., Çelem, E. B., & Önal, S. (2010). Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. *Biochemical Engineering Journal*, 50(3), 110-115.

### P

## Liste des références bibliographique

---

Payens, T. A., Wiersma, A. K., & Brinkhuis, J. (1977). On enzymatic clotting processes I. kinetics of enzyme-triggered coagulation reactions. *Biophysical Chemistry*, 6(3), 253-261.

### R

Ramet, J. P. (1997). Les agents de la transformation du lait; in «Le fromage» éd. Eck et Gillis. *Tec. Doc*, 3, 105-111.

Raskovic, B., Lazic, J., & Polovic, N. (2015). Characterisation of general proteolytic, milk clotting and antifungal activity of *Ficus carica* latex during fruit ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 576–582. doi:10.1002/jsfa.7126

Raskovic, B., Lazic, J., & Polovic, N. (2016). Characterisation of general proteolytic, milk clotting and antifungal activity of *Ficus carica* latex during fruit ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 576-582.

Ribeiro, L. R., Júnior, B. R. D. C. L., Tribst, A. A. L., & Cristianini, M. (2017). Comparative study of the effect of high pressure processing on the residual activity of milk coagulants in buffer and in ultrafiltered cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 82, 1-7.

Robitaille, G., Lapointe, C., Leclerc, D., & 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(1), 1-8.

### S

Siar H., (2014). Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait. Mémoire de magister, Sciences Alimentaires option: Technologies Alimentaires : Université Constantine -1- Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A), 75 pages.

Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H. E., ... & Flaishman, M. A. (2006). Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7717-7723.

## Liste des références bibliographique

---

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*, 82(2), 151-170.

### T

Talantikite-Kellil, S. (2015). Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie (Doctoral dissertation, Université M'hamed Bougara de Boumerdès, Département de Tec).

### V

Van Hooydonk, A. M., & Walstra, P. (1987). Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 41(1), 19-47.

### W

WALSH, M. K., & Li, X. (2000). Thermal stability of acid proteinases. *Journal of dairy research*, 67(4), 637-640.

Wang, X., He, L., Zhao, Q., Chen, H., Shi, Y., Fan, J., ... & Huang, A. (2021). Protein function analysis of germinated *Moringa oleifera* seeds, and purification and characterization of their milk-clotting peptidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 171, 539-549.

Wang, X., Shi, Y., He, R., Li, B., & Huang, A. (2020). Label-free quantitative proteomic analysis of the biological functions of *Moringa oleifera* seed proteins provides insights regarding the milk-clotting proteases. *International journal of biological macromolecules*, 144, 325-333.

### Y

Ye, R., & Harte, F. (2013). Casein maps: effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl<sub>2</sub> on the particle size of reconstituted casein micelles. *Journal of dairy science*, 96(2), 799-805.

### Z

## Liste des références bibliographique

---

Zikiou, A., & Zidoune, M. N. (2019). Enzymatic extract from flowers of Algerian spontaneous *Cynara cardunculus*: Milk-clotting properties and use in the manufacture of a Camembert-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), 89-99.

## Liste des Références électroniques

---

### *Site Web*

<https://www.agenceecofin.com/agro-industrie/1612-83591-algerie-les-importations-de-produits-laitiers-ont-atteint-1-2-milliard-en-2019> (consulter le 26 fevrier 2022 à 10:20).

**Anonyme(I)** :<https://www.avogel.ca/fr/encyclopedie-plantes/silybum-marianum.php>  
(consulter le 02 mars 2022 à 10:04).

**Anonyme(II)** :<https://jardinage.lemonde.fr/dossier-1289-mauve-malva-sylvestris-grande.html>(consulter le 01 mars 2022 à 09:29).

**Anonyme(III)** :<https://ne.chm-cbd.net/biodiversity/la-diversite-biologique-vegetale/les-especes-vegetales-et-leurs-utilites/ricinus-communis> (consulter le 01 mars 2022 à 11:12)

# *Annexe*

**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% ;
- 100 ml d'acide phosphorique à 85% ;
- 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.

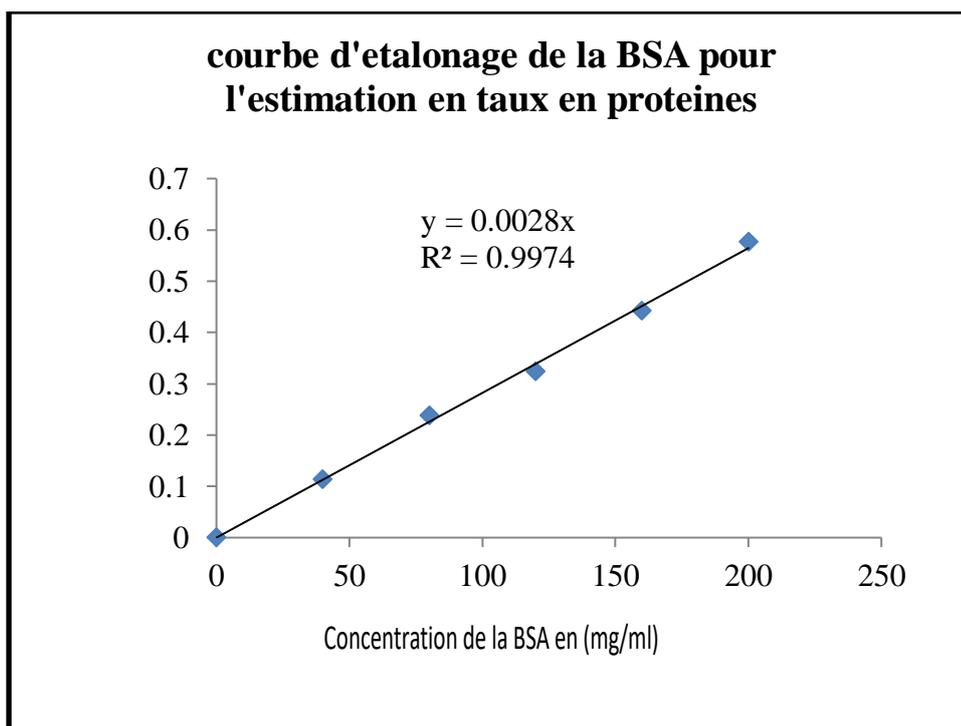
**I-2 Elaboration de la courbe d'étalonnage des protéines**

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					

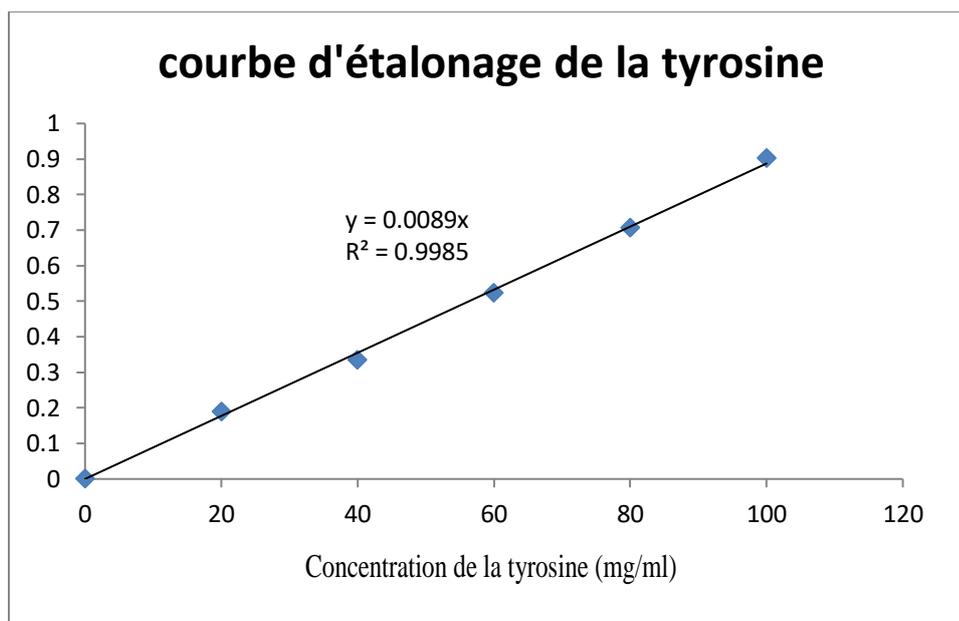


## Annexe II : Mesure de l'activité protéolytique

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

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

N ° Tube	Blanc	1	2	3	4	5
Dilution	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Tyrosine ( $\mu$ l)	0	200	400	600	800	1000
Tampon phosphate 0,1M pH 7 ( $\mu$ l)	1000	800	600	400	200	0
Solution tyrosine ( $\mu$ l)	500					
Solution C ( $\mu$ l)	2.5					
Incubation à 35°C pendant 10 min						
Folin-Ciocalteu ( $\mu$ l)	250					
Incubation à 35°C pendant 20 min						
Lire l'absorbance à 660 nm						



### 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
- équipements 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),
- Tyrosine ;
- Caséine 1% ;

- Chlorure de calcium

## Résumé

L'objectif de ce travail vise à extraire et de caractériser les protéases de certains végétales et d'étudier leur potentiel comme substituts de la présure. La caractérisation physico-chimique a permis de déterminer la teneur en protéines, l'activité coagulante, l'activité protéolytique et le pouvoir coagulant des extraits enzymatiques obtenus. Les résultats ont révélé que les extraits enzymatiques ont une activité coagulante inférieure à celle de la présure mais une teneur en protéines presque identique. Les effets des paramètres physico-chimiques du lait (pH, température, concentration en  $\text{CaCl}_2$ ) et des extraits enzymatiques sur l'activité coagulante des protéases végétales ont été étudiés et les propriétés de ces enzymes leur permettent d'être utilisées comme substituts de la présure.

**Mots clé :** succédanés de présure, extraction, pouvoir coagulant, activité coagulante.

## Abstract

The objective of this work was to extract and characterize proteases from certain plants and to study their potential as rennet substitutes. The physico-chemical characterization was used to determine the protein content, coagulant activity, proteolytic activity and coagulant power of the enzymatic extracts obtained. The results revealed that the enzyme extracts have a lower coagulant activity than rennet but almost identical protein content. The effects of physico-chemical parameters of milk (pH, temperature,  $\text{CaCl}_2$  concentration) and enzyme extracts on the coagulant activity of plant proteases were studied and the properties of these enzymes allow them to be used as rennet substitutes.

**Key words:** rennet substitutes, extraction, coagulation, coagulant activity.