

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Alimentaires
Spécialité : Production et transformation laitière



Réf:.....

Mémoire de fin de cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Extraction et caractérisation de la pepsine de poulet.
Aptitude à la coagulation du lait**

Présenté par :

Mlle. TANKHI Kahina

Soutenu le : 19 /09/2024

Devant le jury composé de :

Mme. BERKATI S.	(MAA)	Président
Mme. FELLA S.	(MCB)	Examineur
Mme. BELHAMICHE N.	(MCB)	Encadreur
Mr. BOUKHALFA F.	(MCA)	Co-encadreur

Année universitaire : 2023/2024

REMERCIEMENTS

Avant tout, je rends grâce à **ALLAH**, Tout-Puissant, de m'avoir donné la force, la patience et le courage nécessaires pour mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma promotrice, **Mme BELHAMICHE N.**, pour son soutien, ses conseils éclairés et ses encouragements tout au long de ce projet. Sa disponibilité et son expertise ont été précieuses pour la réussite de ce travail.

Je remercie également mon co-encadreur, **Mr. BOUKHALFA F.**, pour son accompagnement, ses précieux conseils et le temps qu'il m'a consacré. Son expertise et son soutien m'ont été d'une grande aide.

Mon profond respect va à **Mme. BERKATI S.** pour avoir accepté de présider le jury et d'apprécier la qualité de mon travail.

Je remercie **Mme. FELLA S.** pour avoir accepté de porter un jugement éclairé et d'examiner mon travail.

Un grand merci aux ingénieurs du laboratoire de microbiologie alimentaire, de mycologie et de génie biologique de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Bejaia pour leur assistance technique et scientifique, ainsi que pour leur dévouement tout au long de mes travaux pratiques.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma gratitude à **mes parents**, qui m'ont toujours soutenu avec amour et encouragements dans chaque étape de ma vie. Leur confiance et leur soutien inconditionnel ont été une source de motivation constante.

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à la mémoire de **mon père**, dont l'absence est ressentie chaque jour. Son amour et sa sagesse ont été des sources inépuisables d'inspiration et de force, et son esprit continue de m'accompagner dans chacun de mes pas.

À **ma mère**, dont le soutien inconditionnel et les sacrifices ont été les piliers de ma réussite. Son courage et sa détermination ont été des sources constantes de motivation, et sa présence bienveillante m'a permis de surmonter les défis avec sérénité.

À mes sœurs **Amina, Samia, Assia, Meriem et Naima**, pour leurs encouragements indéfectibles, leur amour et leur compréhension. Leur soutien et leur présence constante ont été des lumières dans les moments les plus sombres et des sources de joie dans les moments de réussite.

À mes frères **Mouloud et Omar**, pour leur solidarité et leur soutien précieux tout au long de ce parcours. Leur aide, leurs conseils et leur affection ont grandement contribué à la réalisation de ce travail.

Que cette dédicace soit le reflet de ma profonde gratitude et de l'impact considérable qu'ils ont eu sur ma vie et ce projet. Je leur exprime ma reconnaissance éternelle pour tout ce qu'ils ont apporté.

Je souhaite également partager cette pensée qui m'a guidé tout au long de ce chemin : « Ce n'est pas cool d'être un perdant. Va à l'école, obtiens ton diplôme, construis ta propre vie. Parce qu'une fois tout est dit et fait, ils peuvent dire ce qu'ils veulent à ton sujet, mais ils ne pourront jamais te l'enlever ».

Kahina

Remerciements
Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux

TABLE DES MATIERES

Introduction 1

I. Synthèse bibliographique

1. Lait 3

1.1. Définition du lait 3

1.2. Composition du lait 3

1.3. Protéines du lait 3

1.3.1. Composition de la micelle de caséine 4

1.3.2. Equilibre minéral du lait 4

1.4. Coagulation du lait 5

1.4.1. Coagulation par voie acide 5

1.4.2. Coagulation enzymatique 5

1.4.3. Coagulation mixte 7

2. Protéases coagulantes 7

2.1. Présure 7

2.1.1. Chymosine 8

2.1.2. Pepsine 8

2.1.3 Trypsine 8

2.2. Succédanés de présure 8

2.2.1. Succédanés d'origine végétale 9

2.2.2. Succédanés d'origine microbienne 10

2.2.3. Succédanés d'origine animale 10

II. Matériel et méthodes

1. Matériel 12

1.1. Proventricule de poulet 12

1.2. Présure 12

1.3. Lait	12
2. Méthodes	12
2.1. Préparation des proventricules de poulet	12
2.2. Obtention de l'extrait pepsique	13
2.3. Etude des extraits enzymatiques	15
2.3.1. Détermination de l'activité coagulante.....	15
2.3.2. Détermination de l'activité protéolytique	15
2.3.3. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques	16
2.4. Caractérisation partielle des extraits enzymatiques	16
2.4.1. Détermination de la température optimale d'activité	16
2.4.2. Effet du pH sur l'activité coagulante.....	17
2.4.3. Effet de la concentration en CaCl ₂	17
2.4.4. Effet de la concentration en extrait enzymatique	17
2.5. Étude de la stabilité thermique	17

III. Résultats et discussion

1. Obtention de l'extrait brut enzymatique	18
2. Activité protéolytique des extraits enzymatiques.....	18
3. Caractérisation des extraits enzymatiques bruts.....	19
3.1. Effet de la température	20
3.2. Effet du pH	20
3.3. Effet de la concentration en CaCl ₂	22
3.4. Effet de la concentration en extrait enzymatique	23
4. Étude de la stabilité thermique	24
Conclusion.....	26

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

BSA : Bovine Serum Albumin

CCP: Complexe Caséino-Phosphocalcique

CMP : Caséinomacropéptide

k-CN : kappa-caséine

PG : Pepsinogène

TCA : Trichloroacetic Acid

UP : Unité de présure

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Modèle de la micelle de caséine	4
2	Mécanisme de coagulation du lait par la présure	6
3	Représentation schématique de l'action de la chymosine sur la κ -caséine	6
4	Schéma du système digestif aviaire et photographie du complexe stomacal du poulet	11
5	Photographie de l'aspect interne des proventricules de poulet	12
6	Photographies des étapes de l'extraction de la pepsine de poulet	13
7	Diagramme de l'extraction de la pepsine de poulet	14
8	Taux des produits d'hydrolyse libérés au cours de la protéolyse	18
9	Effet de la température du lait sur l'activité coagulante	19
10	Effet du pH du lait sur l'activité coagulante	21
11	Effet de la concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante	22
12	Effet de la concentration en extrait enzymatique	23
13	Stabilité thermique des extraits coagulants	24

Liste des figures en annexes

Figure	Titre
1	Courbe étalonnage de la tyrosine
2	Courbe étalonnage de la BSA

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Composition moyenne du lait	3

Introduction

Le lait est une émulsion biologique produite par les glandes mammaires des mammifères. Il constitue la principale source de nutrition pour les nouveau-nés avant qu'ils puissent consommer d'autres types d'aliments. Sa composition chimique complexe comprend des macronutriments essentiels tels que les protéines, les lipides et les glucides, ainsi que des micronutriments comme les vitamines et les minéraux, qui sont cruciaux pour le développement et le maintien de la santé (Fox, 2015).

Les premiers fromages auraient été découverts par hasard par des nomades du Moyen-Orient et d'Asie centrale, qui transportaient le lait dans des peaux et des organes internes d'animaux. La présence de présure, une enzyme naturelle provoquant la coagulation du lait, dans ces « estomacs-récipients » aurait transformé le lait en caillé, donnant ainsi naissance au fromage blanc. Le lait caillé aurait été consommé depuis le Néolithique en Mésopotamie, en Palestine et en Égypte. Chaque société aurait adapté le lait caillé selon son environnement, ses contraintes et sa culture (Cesbron-Lavau, 2016).

La coagulation du lait par une enzyme caséinolytique est une étape cruciale dans la fabrication de la plupart des types de fromages. L'enzyme traditionnelle la plus couramment utilisée dans l'industrie fromagère à cette fin est la présure animale, dérivée du quatrième estomac d'un jeune veau. Cependant, en raison de l'augmentation continue de la consommation mondiale de fromage, la présure de veau ne parvient pas à répondre aux demandes croissantes de la production de fromage (Johnson, 2017). Plusieurs autres enzymes de coagulation du lait provenant de sources aviaires, bovines et porcines (Fox et *al.*, 2017), fongiques (Fox et *al.*, 2017), bactériennes et végétales (Bruno et *al.*, 2010), ainsi que la chymosine recombinante produite par des micro-organismes génétiquement modifiés (Júnior et *al.*, 2017) ont été explorées pour être utilisées dans la fabrication fromagère dont certaines d'entre elles ont été utilisées à l'échelle industrielle. L'utilisation de la chymosine recombinante issue d'organismes génétiquement modifiés pourrait susciter des inquiétudes chez les consommateurs dans certains pays (Egito et *al.*, 2007). Par conséquent, la recherche de protéases alternatives pour la coagulation du lait se poursuit.

La pepsine est une protéase largement utilisée dans les industries alimentaires, provenant principalement de sources porcines, ovines, bovines, avicoles et aquatiques. En Algérie, l'utilisation des enzymes coagulantes dépend de leur importation. Cependant, l'augmentation de l'élevage de volailles, passant de 220 000 tonnes en 2008 à 300 000 tonnes en 2011, ainsi que la hausse de la production laitière, de 1,5 milliard de litres en 2008 à 2

milliards de litres en 2012, selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, représente une incitation suffisante pour exploiter et utiliser localement la pepsine de poulet pour la coagulation du lait. Cela permettrait de réduire les coûts d'importation des protéinases. Les investisseurs algériens intéressés par la production de cette enzyme pourraient ainsi contribuer au développement de l'industrie avicole. Pour rassurer les investisseurs sur la faisabilité de l'utilisation de la pepsine de poulet comme agent coagulant, il est nécessaire de la comparer avec la présure, coagulant traditionnel de référence (Benyahia-Krid, 2016). Cette recherche vise à exploiter et évaluer les propriétés de la pepsine de poulet pour son utilisation dans la coagulation du lait en tant que substitut de la présure.

L'objectif de notre travail consiste en la contribution à l'étude d'un succédané de la présure animale obtenu à partir d'un coproduit de l'industrie avicole, le proventricule de poulet *Gallus gallus*. Pour cela, nous avons d'abord procédé à l'obtention de l'extrait pepsique puis à sa caractérisation partielle en le comparant à la présure industrielle.

Notre manuscrit est structuré en trois parties. La première partie est dédiée à une synthèse bibliographique divisée en deux chapitres : le lait et les protéases coagulantes.

La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisés pour réaliser cette étude. Enfin, la troisième partie expose les résultats obtenus et leur discussion, suivie d'une conclusion générale.

Synthèse

Bibliographique

1. Lait

1.1. Définition du lait

La première définition du lait apparaît en 1908, au Congrès international de la Répression des Fraudes de Paris. Le mot « lait » a été défini comme : « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum ». Le décret du 25 mars 1924 précise que la dénomination « lait » sans indication de l'espèce animale de provenance est réservée au lait de vache. Tout lait provenant d'une femelle laitière autre que la vache doit être désigné par la dénomination « lait » suivie de l'indication de l'espèce dont il provient : « lait de chèvre », « lait de brebis » ...etc. (Noblet, 2012).

1.2. Composition du lait

Le lait est principalement constitué d'eau, avec des proportions significatives de protéines (azotées et non azotées), de glucides, d'acides gras, de vitamines et de minéraux. Les détails de sa composition moyenne sont présentés dans le tableau I (Fredot, 2005).

Tableau I. Composition moyenne du lait entier (g/100g) (Fredot, 2005)

Composants	Teneur (g/100g)
Eau	89.5
Protéines	3.27
Matière grasse	3.5
Glucides	4.8
Lactose	4.7
Gaz dissout	5
Dérivés azotes	3.44
Extrait sec total	12.8

1.3. Protéines du lait

Le lait de vache, ainsi que celui d'autres espèces, contient deux grandes catégories de protéines : les caséines et les protéines de lactosérum. Les caséines constituent la majorité des protéines, représentant environ 80 % du total, soit environ 27 g par litre de lait. Les principales caséines incluent l' α s1-caséine, l' α s2-caséine, la β -caséine et la κ -caséine, avec des proportions respectives d'environ 4:1:4:1. Ce sont ces caséines qui coagulent lors de la fabrication du fromage. Les protéines restantes se trouvent dans le lactosérum, sous-produit du processus fromager. La β -lactoglobuline est la protéine prédominante du lactosérum, aux côtés d'autres

protéines importantes comme la β -lactalbumine, l'albumine sérique bovine et les immunoglobulines (Anonyme, 1991).

1.3.1. Composition de la micelle de caséine

Les micelles de caséine se composent de sous-micelles sphériques maintenues ensemble par du phosphate de calcium colloïdal, des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène. Selon Amiot et al. (2002), les α - et β -caséines forment le noyau hydrophobe des sous-micelles, tandis que la κ -caséine se situe principalement à la surface, formant une couche protectrice qui stabilise les micelles et prévient la floculation. Les deux tiers N-terminaux des chaînes polypeptidiques de la κ -caséine sont hydrophobes et interagissent avec les protéines du noyau, tandis que la queue hydrophile C-terminale, d'environ 70 résidus d'acides aminés, s'étend dans l'environnement aqueux. Ces protubérances hydrophiles confèrent aux micelles une apparence "poilue", favorisant leur solubilité et empêchant les sous-micelles de se rapprocher trop étroitement. Un modèle de la micelle de caséine est illustré par la figure 1 (Amiot et al., 2002).

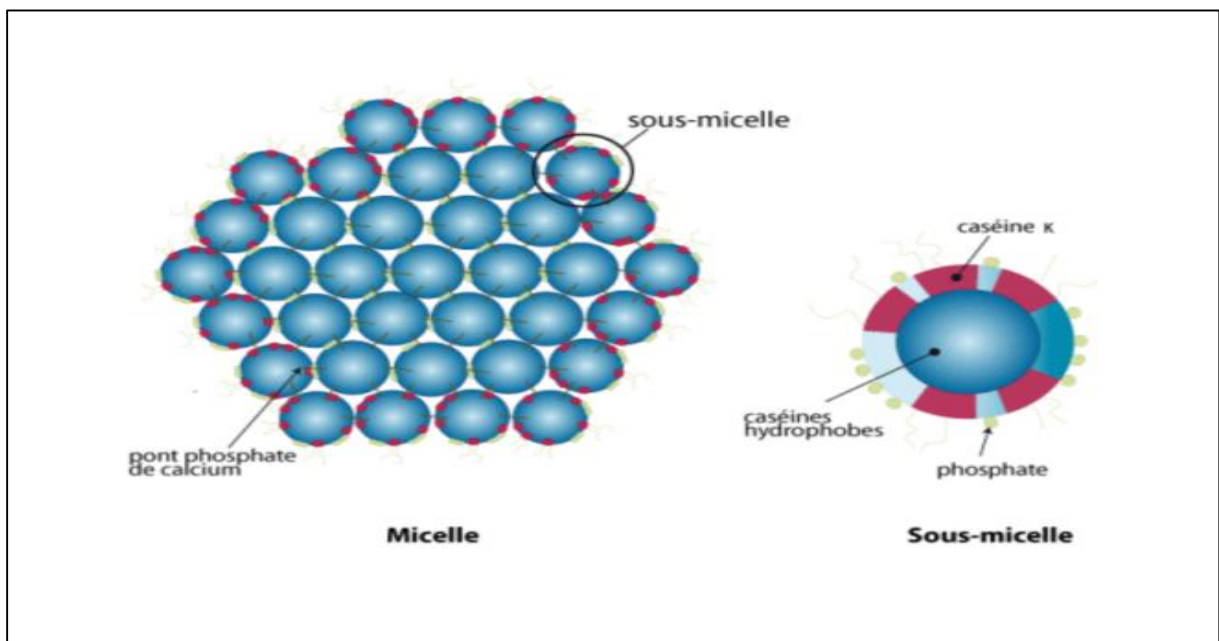


Figure 1 : Modèle de la micelle de caséine (Amiot et al., 2002)

1.3.2. Equilibre minéral du lait

Les sels sont répartis entre les phases colloïdale et soluble du lait. Le sodium, le potassium et le chlorure sont presque totalement dissous dans la phase aqueuse du lait, tandis qu'une partie du calcium, du phosphore, du magnésium et du citrate est liée aux micelles de caséine (Gaucheron, 2005). Les minéraux insolubles, présents sous forme de nanoparticules,

agissent comme des agents de réticulation dans la structure des micelles de caséine (Holt, 2004). Les molécules de caséine contiennent des résidus de phosphosérine, qui sont les sites de liaison pour les nanoparticules de phosphate de calcium. Le calcium et le magnésium peuvent également se lier directement aux résidus de phosphosérine, de glutamique et d'aspartique (Bauland et al. 2020).

1.4. Coagulation du lait

La coagulation du lait est une étape clé dans la production de produits laitiers fermentés et constitue la base du développement structurel du yaourt et du fromage. Les méthodes de coagulation induites par l'acide et la présure sont les plus courantes pour produire des gels de lait (Lefebvre-Cases et *al.*, 1998).

1.4.1. Coagulation par voie acide

Cette coagulation se produit en présence d'acides ou de cultures lactiques qui transforment le lactose en acide lactique. Cette transformation abaisse le pH, provoquant des changements dans les micelles de caséine : la charge ionique des micelles diminue progressivement jusqu'à devenir nulle, tandis que le phosphate de calcium présent dans les micelles devient soluble, entraînant la dissolution des micelles et la formation du gel. Ce processus conduit à l'hydratation et à la modification des caséines, qui se lient entre elles par des interactions hydrophobes (Lefebvre-Cases et *al.*, 1998).

1.4.2. Coagulation enzymatique

Pendant la coagulation par voie enzymatique, la présure agit sur la liaison Phe105–Met106 de la κ -CN, ce qui entraîne la production de caséinomacropéptide (CMP) et de para- κ -CN, réduisant ainsi la répulsion électrostatique et la stabilisation stérique des micelles de caséine. Lorsque plus de 90 % du CMP est éliminé, les micelles de caséine s'agrègent pour former un gel (Lefebvre-Cases et *al.* 1998 ; Amaro-Hernández et *al.*, 2022 ; Munoz et *al.*, 2023). Le mécanisme de la coagulation du lait est illustré dans la figure 2. La coagulation du lait par la présure est un processus qui se déroule en trois étapes :

- **Phase primaire de la coagulation**

La chymosine présente dans la présure clive la κ -caséine au niveau de la position Phe105 Met106, libérant ainsi le caséinomacropéptide (fragment C-terminal 106–169) dans la phase liquide du lait (Corredig et Salvatore, 2016 ; Horne et Lucey, 2017) (figure 3). Après le clivage de la κ -caséine par la présure, le diamètre des micelles de caséine diminue d'environ 10 nm

(Sandra et *al.*, 2007). La libération du caséinomacropeptide (CMP) entraîne une diminution du potentiel zêta des micelles de caséine, passant de -20 mV à environ -10 mV (McSweeney, 2007), ce qui réduit les forces de répulsion et permet un rapprochement plus étroit des micelles de para-caséine.

Figure 2 : Mécanisme de coagulation du lait par la présure (Florian, 2012).

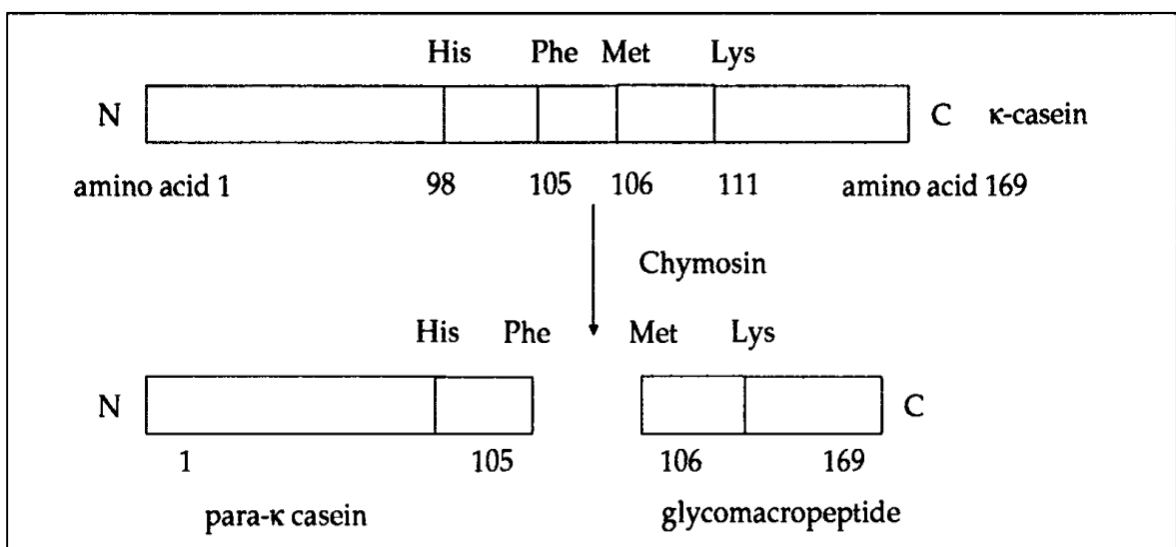
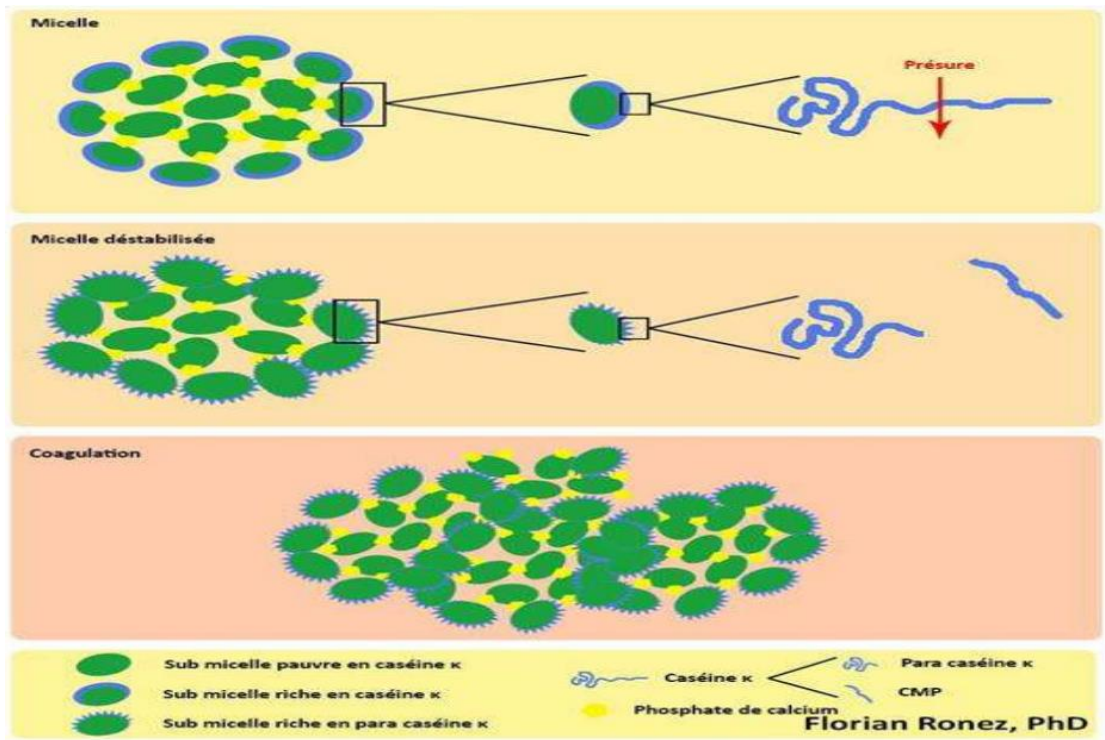


Figure 3 : Représentation schématique de l'action de la chymosine sur la κ -caséine (Anonyme,1991).

- **Phase secondaire de la coagulation**

La phase secondaire de la coagulation consiste en l'agrégation et la gélification des micelles destabilisées (Horne et Lucey, 2017). Selon McSweeney (2007), lorsqu'environ 80 % à 90 % de la κ -caséine est hydrolysée, les micelles commencent à s'agréger par des interactions hydrophobes et des ponts de calcium, formant ainsi un réseau de gel. Les pores du gel sont relativement grands et contiennent du lactosérum et des globules de graisse.

L'agrégation se produit à un degré plus faible d'hydrolyse de la κ -caséine lorsque la température et la concentration en calcium ionique augmentent, ou lorsque le pH diminue (McSweeney, 2007 ; Corredig et Salvatore, 2016).

- **Phase tertiaire (formation du gel)**

Une fois que les micelles de caséine ont été destabilisées et agrégées, elles commencent à se lier entre elles par des interactions hydrophobes et des ponts de calcium, formant ainsi un réseau tridimensionnel de gel. Les protéines de caséine, en particulier la para- κ -caséine (qui reste attachée aux micelles après hydrolyse de la κ -caséine), jouent un rôle clé dans la stabilisation de ce réseau (Horne, 2006).

1.4.3. Coagulation mixte

Ce type de coagulation résulte de l'action combinée d'une enzyme spécifique et de l'acidification. Les différentes combinaisons de ces facteurs conduisent à différents états d'équilibre spécifiques, ce qui explique la grande diversité des fromages à pâte molle et à pâte pressée non cuite (Munoz et *al.*, 2023)

2. Protéases coagulantes

2.1. Présure

La "présure" désigne l'extrait coagulant obtenu à partir des caillettes de jeunes ruminants (bovins) abattus avant sevrage. Utilisée encore aujourd'hui en technologie fromagère, elle est généralement commercialisée sous forme liquide ou en poudre. Elle est principalement composée de chymosine, de pepsine et en moindre quantité de trypsine, toutes sécrétées dans le quatrième estomac des ruminants non sevrés. Ces enzymes appartiennent à la famille des protéinases aspartiques en raison de la présence de deux résidus distinctifs dans leur site actif. Chez l'animal, ces protéinases sont initialement sécrétées sous forme de précurseurs, la

prochymosine et le pepsinogène, présents dans le mucus stomacal et destinés à digérer le lait maternel (Luquet, 1985).

2.1.1. Chymosine

La chymosine bovine (rennine, EC 3.4.23.4.) est une protéase acide synthétisée sous forme de précurseur pré-pro-chymosine. À travers une série de clivages protéolytiques de son extrémité amino-terminale, le pré-pro-chymosine est d'abord converti, lors de sa sécrétion dans l'estomac, en pro-chymosine composée de 365 acides aminés et ayant un poids moléculaire de 40 500 Da. La pro-chymosine est enzymatiquement inactive, mais elle est convertie de manière auto catalytique en une enzyme active à pH acide. À pH 4,5, 42 acides aminés N-terminaux sont enlevés, produisant de la chymosine active avec un poids moléculaire de 35 600, tandis qu'à pH 2,0, seuls 27 acides aminés sont enlevés, produisant de la pseudo-chymosine avec un poids moléculaire de 37 400 Da. Une fois formée, la pseudo-chymosine est relativement stable à un pH inférieur à 3 ou supérieur à 6, mais elle est ensuite convertie en chymosine par incubation à pH 4,5 (Anonyme, 1991).

2.1.2. Pepsine

Le pepsinogène est la forme inactive de la pepsine (EC 3.4.23.1), une enzyme digestive endogène majeure présente dans l'estomac des animaux. La pepsine est également une protéase commerciale importante utilisée dans divers secteurs tels que l'industrie alimentaire. Selon Nalinanon et *al.* (2010), le pepsinogène se transforme en pepsine active dans un environnement acide. La pepsine montre une préférence particulière pour les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) situés à l'extrémité N-terminale des protéines (Haard, 1992 ; Klomklao et *al.*, 2007).

2.1.3 Trypsine

La trypsine est une protéine de 201 acides aminés d'un poids moléculaire de 23 kDa et qui possède quatre ponts disulfures. La trypsine est synthétisée par les cellules acines du pancréas sous forme d'une pro-enzyme qui inactive le trypsinogène. Il existe en fait deux trypsines originaires de deux isoformes différentes du trypsinogène mais à capacités catalytiques quasi-identiques. Cette activité protéolytique est très intense ; elle se manifeste au niveau des liaisons carboxyliques de la lysine et de l'arginine (Gaillard, 2003).

2.2. Succédanés de présure

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

Cependant, outre la bonne solubilité dans l'eau, le degré de pureté élevé et l'activité protéolytique et lipolytique faibles, un succédané de présure, selon Smeets (1995), doit répondre aux critères suivants :

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

2.2.1. Succédanés d'origine végétale

De nombreuses protéinases d'origine végétale sont capables de cailler le lait dans des conditions appropriées, telles que la papaine et la ficine. Les protéases de l'artichaut sauvage (*Cynara cardunculus*) ont fait l'objet de plusieurs études. Les recherches de Vioque et *al.* (2000) ainsi que celles de Zhao et *al.* (2003), ont montré que l'extrait coagulant de la fleur d'artichaut présente deux protéases acides aspartiques : la cardosine A, tout comme la chymosine, est responsable de l'activité coagulante et la cardosine B, similaire à la pepsine, est la principale responsable de l'activité protéolytique.

Il faut noter que les coagulants d'origine végétale sont peu utilisés en technologie laitière. Selon Green (1977), ces enzymes ont une activité protéolytique non spécifique élevée par rapport à leur activité spécifique de coagulation du lait. Par conséquent, elles hydrolysent le coagulum trop rapidement, ce qui entraîne une réduction du rendement en fromage et/ou des défauts dans le fromage avec une tendance à l'amertume.

2.2.2. Succédanés d'origine microbienne

D'innombrables coagulases d'origine bactérienne et fongique ont été étudiées et utilisées afin de pallier la pénurie mondiale de la présure traditionnelle. Parmi les succédanés bactériens on note le genre le plus étudié *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus polymexa*). Cependant, l'activité protéolytique trop élevée des enzymes bactériennes, comparativement à la présure, a fait que l'utilisation de ces protéases n'a pas dépassé le stade expérimental (Luquet, 1985). En revanche, les protéases fongiques ont donné de meilleurs résultats. Ainsi, parmi les espèces fongiques à pouvoir coagulant, seules trois moisissures sont exploitées par les grandes usines de fermentation en vue de la production de coagulases. Il s'agit de : *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* et *Endothia parasitica* (Luquet, 1985, Goursaud, 1999).

2.2.3. Succédanés d'origine animale

Les expérimentations ont porté sur plusieurs protéases d'origine animale en vue de leur utilisation potentielle dans l'industrie fromagère. La trypsine et la chymotrypsine entraînent des modifications significatives dans les méthodes de fabrication et la qualité des produits finis en raison de leur forte activité protéolytique.

La pepsine bovine est un composant mineur normal de la présure, mais sa sécrétion devient prédominante après le sevrage. Elle est très similaire à la chymosine et montre une activité moins dépendante du pH que la pepsine porcine. Cette enzyme coagulante est extraite des caillottes de bovins adultes sevrés et contient, dans des proportions variables, les mêmes protéases que la présure : chymosine (6 à 9 %), gastricine (6 à 9 %), et pepsine (85 à 93 %). Cependant, son activité coagulante est sensiblement inférieure à celle de la présure (Martin, 1984).

La pepsine porcine, extraite de la muqueuse gastrique du porc sous forme inactive, est une enzyme protéolytique qui fonctionne de manière optimale dans un environnement acide, mais son efficacité diminue significativement au-delà d'un pH de 6,3 (Adoui, 2007).

La pepsine de poulet est extraite à partir de proventricules du poulet (*Gallus gallus*), considérés comme sous-produits d'abattage.

Le proventricule, ou estomac glandulaire, est l'équivalent de l'estomac des mammifères et est situé plus près de la bouche que le gésier, ou estomac musculaire. C'est un organe relativement petit et fusiforme, connecté à la bouche par l'œsophage et séparé du gésier par un isthme appelé zona intermedia (figure 4). Comme son nom l'indique, l'estomac glandulaire est revêtu d'une membrane qui produit du mucus pour protéger les cellules épithéliales de

l'environnement acide. De plus, dans cette tunica mucosa, on peut observer les ouvertures des glandes proventriculaires profondes composées de cellules peptiques oxyntiques. Celles-ci sécrètent de l'acide chlorhydrique (acide gastrique) et de la pepsinogène, tous deux importants pour la digestion (Rodrigues, 2018). Le complexe stomacal du poulet est illustré par la figure 4.

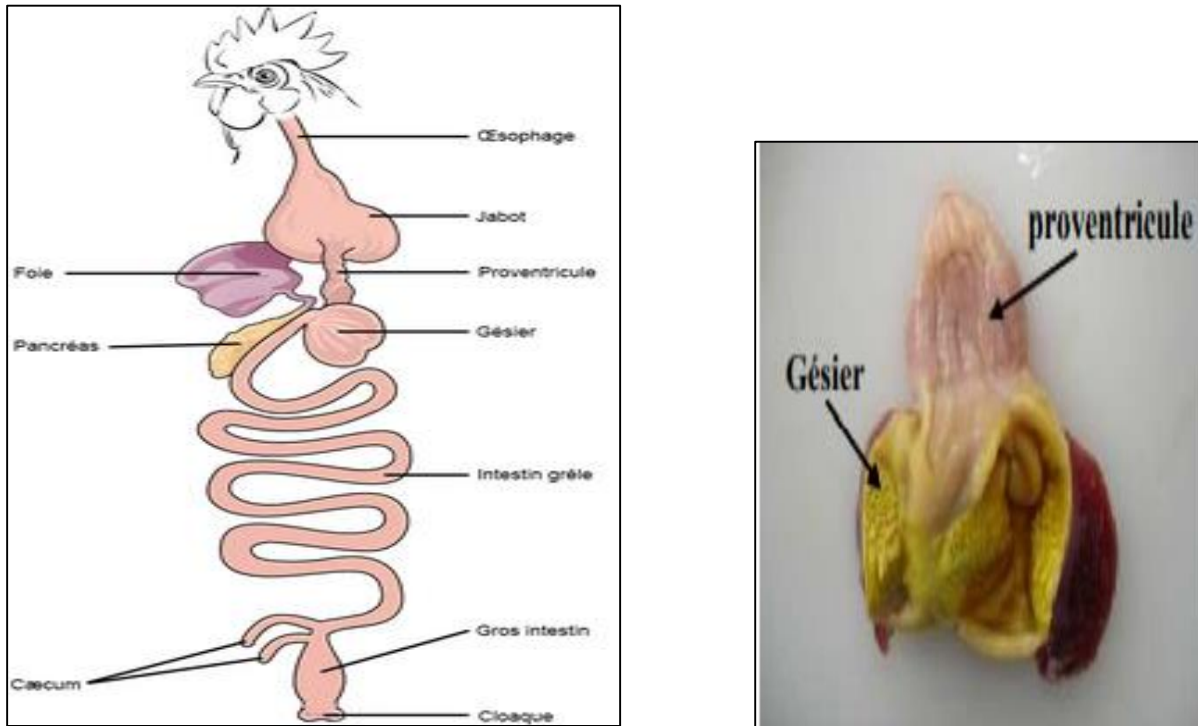


Figure 4 : Schéma du système digestif aviaire et photographie du complexe stomacal du poulet.

Selon Bohak (1969), le pepsinogène de poulet est constitué de 387 résidus d'acides aminés, tandis que la pepsine purifiée en contient 308. Elle se caractérise par une activité catalytique maximale qui se situe entre pH 1,5 et 4,5, atteignant 90 % de son activité maximale à pH 1,5 et 35 % à pH 4,5. Le pepsinogène de poulet reste stable à des températures jusqu'à 24 °C et en dessous de pH 10,5, tandis que la pepsine de poulet conserve sa stabilité en dessous de pH 8,0. Au-delà de pH 8,5, elle se dénature rapidement.

Une étude menée par Paez De Leon et *al.* (1995) sur l'utilisation d'une pepsine isolée des estomacs de poulet, comme agent coagulant dans la production industrielle de fromages blancs pasteurisés. Comparés à ceux obtenus avec de la présure, les résultats pour le fromage à pâte molle n'ont montré aucune différence significative en termes de rendement et de qualité (Morsli, 1997).

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Proventricules de poulet

Le proventricule, également appelé ventricule succenturié, est une structure anatomique de l'appareil digestif en forme de poche située avant l'estomac, ou chez l'oiseau, dans la partie amont du gésier. Une quantité d'environ 600 g de proventricules a été récupérée du marché couvert situé à Lakhmis (wilaya de Bejaia).

1.2. Présure

La poudre de la présure commerciale utilisée dans cette étude provient de la laiterie de Boudouaou (wilaya de Boumerdes). Elle est conservée à + 4°C. Une solution mère est préparée par reconstitution de 1 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée.

1.3. Lait

Le lait de vache utilisé est un lait écrémé en poudre, de type "moyenne température" (Low heat), avec une teneur en matière grasse de 0 %. Il est fourni par l'industrie Hammadite de Bejaia et est stocké à +4°C, à l'abri de la lumière et de l'humidité (Berridge, 1945).

2. Méthodes

2.1. Préparation des proventricules de poulet

Après récupération des proventricules, un dégraissage immédiat est effectué au laboratoire pour éliminer les graisses superflues. Ils sont ensuite ouverts par une incision longitudinale afin de permettre un nettoyage minutieux des particules alimentaires adhérentes (figure 5). Un rinçage à l'eau courante est réalisé afin d'enlever tout résidu restant. Après égouttage, les proventricules sont ensuite répartis en lots de 100 g dans des boîtes en plastique pour faciliter leur stockage à -20°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.



Figure 5 : Photographie de l'aspect interne des proventricules de poulet

2.2. Obtention de l'extrait pepsique

Le protocole préconisé par Bohak (1970) a été suivi pour extraire la pepsine de poulet. Les différentes étapes sont détaillées dans la figure 6 et le diagramme d'extraction est illustré par la figure 7.

100 g de proventricules, préalablement décongelés à 4°C, sont hachés à l'aide d'un hachoir (figure 6 (1)). Les proventricules broyés sont mis dans 300 ml du tampon de macération pendant 3 heures, à température ambiante et sous agitation (figure 6 (2)). Le macérât obtenu est filtré à l'aide de la gaze (figure 6 (3)). Le pepsinogène (pH 6) récupéré (figure 6 (4)) est ensuite activé par l'ajout d'une solution d'HCl 3N jusqu'à ce que le pH atteigne 2 (figure 6 (5)). Après repos pendant 15 minutes à température ambiante, le pepsinogène ainsi activé subit une centrifugation pendant 30 minutes à 5000 g et à 4°C (figure 6 (6,7)). Le surnageant clarifié (figure 6, (8)) est récupéré et le pH est ajusté à 6,4. Enfin, après filtration, l'extrait brut (figure 6, (9)), répartie en petites quantités dans des tubes, est congelé à -20°C.

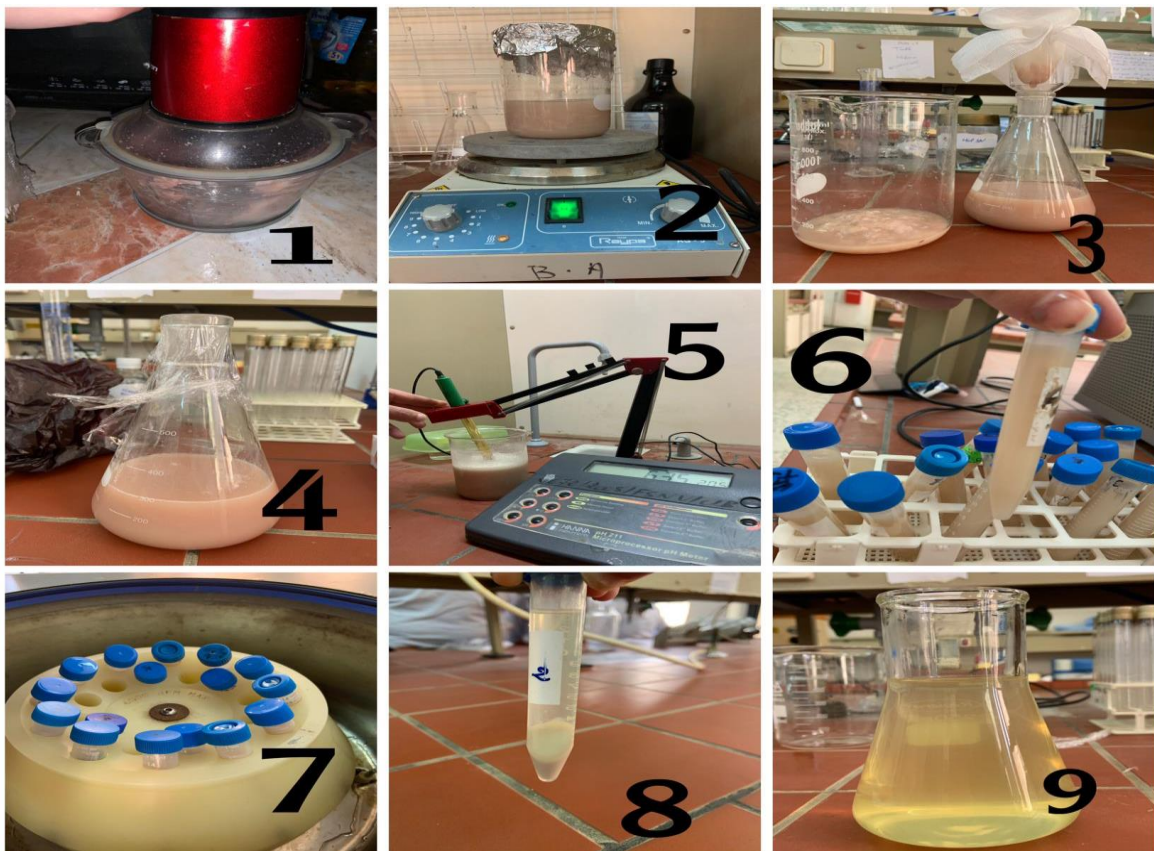


Figure 6 : Photographies des étapes de l'extraction de la pepsine de poulet

1 : hachage des proventricules, 2 : macération, 3 : filtration, 4 : filtrat, 5 : activation du pepsinogène, 6 : macérât avant centrifugation, 7 : centrifugation à + 4 °C, 8 : surnageant et culot, 9 : extrait brut.

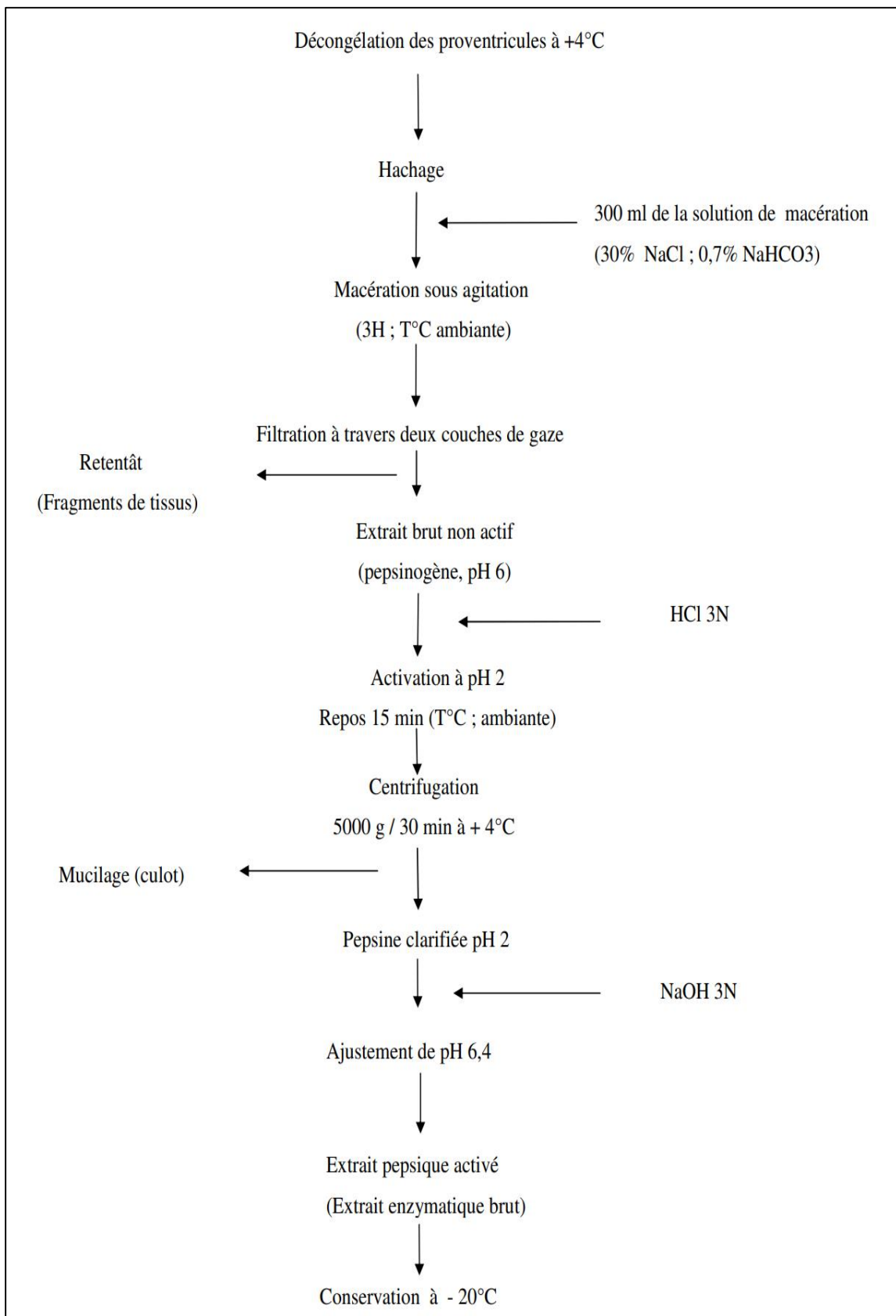


Figure 7 : Diagramme de l'extraction de la pepsine de poulet (Bohak, 1970)

2.3. Etude des extraits enzymatiques

2.3.1. Détermination de l'activité coagulante

La méthode de Berridge (1945) modifiée par Collin et *al.* (1977) a été utilisée pour mesurer l'activité coagulante. Elle permet d'exprimer l'activité de l'extrait enzymatique en unité de présure (UP), qui correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour coaguler 10 ml de substrat standard en 100 secondes à 35°C. L'unité de présure est calculée selon l'expression suivante :

$$UP = \frac{10 \times V}{T \times v}$$

Où :

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

T : temps de floculation (sec)

v : volume de l'extrait enzymatique ajouté (ml)

- **Préparation du substrat de Berridge**

Pour mesurer l'activité coagulante, le lait écrémé reconstitué de type « low heat » est utilisé comme substrat. Ce dernier est préparé en faisant dissoudre 12 g de la poudre de lait dans 100 ml de solution de chlorure de calcium (CaCl₂) à 0,01 M. Après 30 minutes d'agitation lente, le pH du lait est ajusté à 6,4 (Berridge, 1945).

La température du lait est ramenée à 35°C afin de mesurer le temps de coagulation qui correspond à l'apparition des premiers flocons sur la paroi interne du tube dans les conditions de réaction.

2.3.2. Détermination de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée selon la méthode décrite par Green et Stackpoole (1975). Cette méthode permet d'évaluer le taux de dégradation de la caséine par l'enzyme pendant la phase primaire de l'hydrolyse. La concentration des produits d'hydrolyse de la

caséine, solubles dans l'acide trichloracétique (TCA) à 12 %, est mesurée. Le dosage des peptides solubles est effectué selon la méthode de Lowry et *al.* (1951) (annexe I).

Le taux d'hydrolyse de la caséine est déterminé à l'aide d'une courbe étalon établie en utilisant la tyrosine comme standard (100 µg/ml) (annexe I, figure1). Les extraits enzymatiques sont dilués de façon à obtenir un temps de coagulation de 5 min à 35°C selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante (Green et *al.*, 1984).

2.3.3. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques

Le dosage des protéines totales dans les extraits enzymatiques est réalisé selon la méthode de Bradford (1976).

Cette méthode colorimétrique repose sur l'adsorption du bleu de Coomassie G-250 aux protéines, en particulier celles contenant des acides aminés basiques tels que l'arginine, la lysine et l'histidine. Lors de la liaison aux protéines, la couleur du réactif change, passant au bleu avec une absorbance maximale autour de 595 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de protéines dans l'échantillon.

Pour chaque extrait enzymatique de 1 ml, 5 ml de réactif de Bradford sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé au vortex, puis incubé à l'obscurité pendant 5 minutes. L'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration en protéines des extraits enzymatiques est déterminée au moyen d'une courbe étalon établie avec le sérum d'albumine bovin (B.S.A. à 100 µg/ml) comme protéine standard (annexe II, figure 2).

2.4. Caractérisation partielle des extraits enzymatiques

La caractérisation des extraits enzymatiques bruts consiste en la détermination des conditions optimales de l'activité coagulante en fonction de certains facteurs. La mesure de l'activité coagulante est déterminée en mesurant le temps de coagulation selon la méthode de Berridge (1945) modifiée par Collin et *al.* (1977). Les résultats sont exprimés en terme d'activité relative (%).

2.4.1. Détermination de la température optimale d'activité

La température optimale de coagulation du lait a été déterminée en portant le mélange réactionnel à différentes températures de 30°C à 70°C avec un intervalle de 5°C.

2.4.2. Effet du pH sur l'activité coagulante

L'influence du pH du lait sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés a été déterminé en faisant varier le pH du lait de 5 à 7,5 avec un intervalle de 0,5.

2.4.3. Effet de la concentration en CaCl₂

L'influence de la concentration en CaCl₂ sur l'activité coagulante a été déterminée en faisant varier la concentration du lait en ions CaCl₂ de 0,00 M à 0,1 M avec un intervalle de 0,01.

2.4.4. Effet de la concentration en extrait enzymatique

Les activités coagulantes ont été déterminés en faisant varier la concentration des extraits de 70 mg/ml à 196 mg/ml.

2.5. Etude de la stabilité thermique

La stabilité thermique de l'extrait pepsique et de la présure a été réalisée après leur incubation à des températures variant de 30°C à 70°C pendant 30 minutes. Les résultats sont exprimés en activité résiduelle (%).

Résultats et discussion

1. Obtention de l'extrait brut enzymatique

L'extrait coagulant de la pepsine de poulet est un liquide jaune clair avec une légère odeur prononcée. Il présente un temps de coagulation très rapide de 25 secondes. Cet extrait brut se distingue par une activité coagulante de 4 UP /ml et une teneur en protéines de 68,89 mg/ml. L'extrait enzymatique clarifié obtenu est d'environ 250 ml pour chaque 100 g de proventricules ce qui correspond à un rendement d'extraction moyen de 82,73 %.

L'activité coagulante observée dans cette étude est similaire à celle rapportée par Yang et *al.* en 2022. La teneur en protéines totales dans l'extrait obtenu est proche à celle rapportée par Wehaidy et *al.* en 2023, qui ont indiqué un taux de 70,38 mg/ml.

2. Activité protéolytique des extraits

L'activité protéolytique évalue les peptides produits par la rupture enzymatique de différentes fractions de micelles de caséine. Elle constitue donc un indicateur de l'hydrolyse non ciblée de la caséine par l'action des enzymes (Leite Júnior et *al.*, 2015).

Les résultats obtenus, rapportés par la figure 8, indiquent que l'extrait pepsique présente une activité protéolytique plus élevée que la présure traditionnelle. En effet, l'activité protéolytique mesurée s'élève à environ 52,81 $\mu\text{g/ml}$, tandis qu'elle est de 48,31 $\mu\text{g/ml}$ pour la présure animale. L'étude de Siar (2014) a rapporté un taux de 117 $\mu\text{g/ml}$ soit une activité protéolytique trois fois plus élevée que la présure.

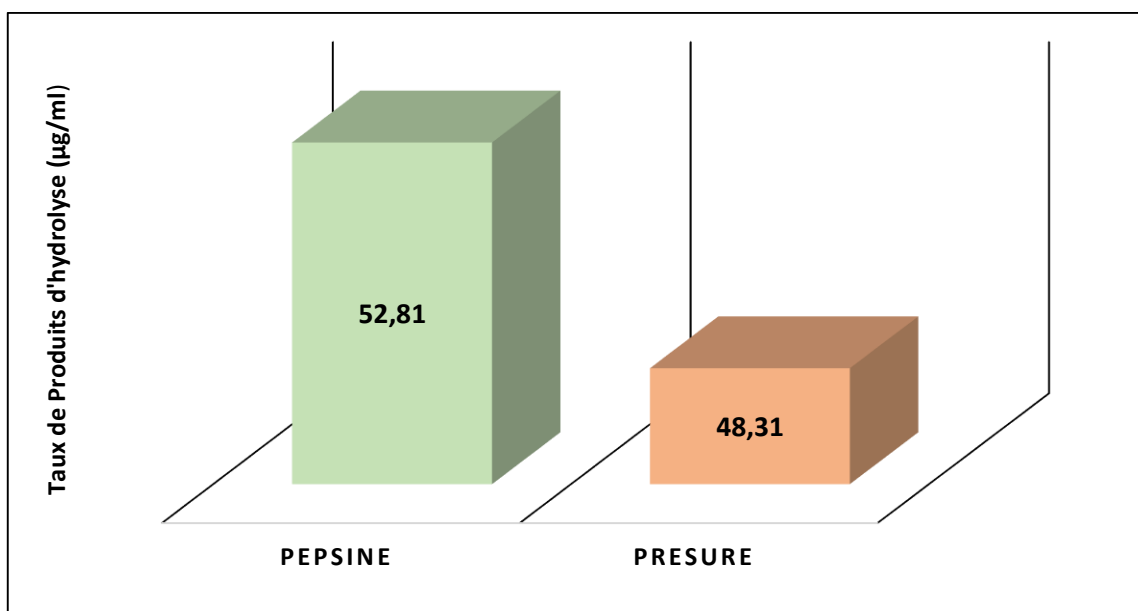


Figure 8 : Taux des produits d'hydrolyse libérés au cours de la protéolyse

La faible activité observée pour la présure peut être expliquée par sa nature protéolytique spécifique et limitée. Plus précisément, durant la première phase de la dégradation enzymatique, la présure cible de manière précise la caséine κ , en clivant la liaison peptidique entre les résidus Phe105 et Met106. Ce clivage spécifique conduit à la formation de peptides qui sont essentiels pour la coagulation du lait. En revanche, les caséines α et β , qui constituent également des composants importants du lait, ne sont pas modifiées par cette enzyme (Alais, 1984). Cette sélectivité marquée de la présure pour la caséine κ est importante pour son rôle dans l'industrie fromagère (Danley *et al.*, 1988).

3. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut

3.1 Effet de la température sur l'activité coagulante

Pour déterminer la température optimale d'activité de la pepsine de poulet et de la présure, le temps de coagulation du lait a été mesuré à différentes températures, allant de 30°C à 70°C.

Les résultats obtenus, illustrés par la figure 9, montrent une différence de comportement entre les deux extraits enzymatiques en fonction de la température. L'extrait pepsique atteint son optimum d'action à 55°C, tandis que la température optimale de la présure animale est obtenue à 50°C. De plus, la pepsine de poulet, en comparaison avec la présure animale, présente une activité enzymatique encore à 60°C, tandis que la présure est complètement inactivée à cette température. Ce résultat peut être avantageux dans certaines applications industrielles où des températures élevées sont nécessaires.

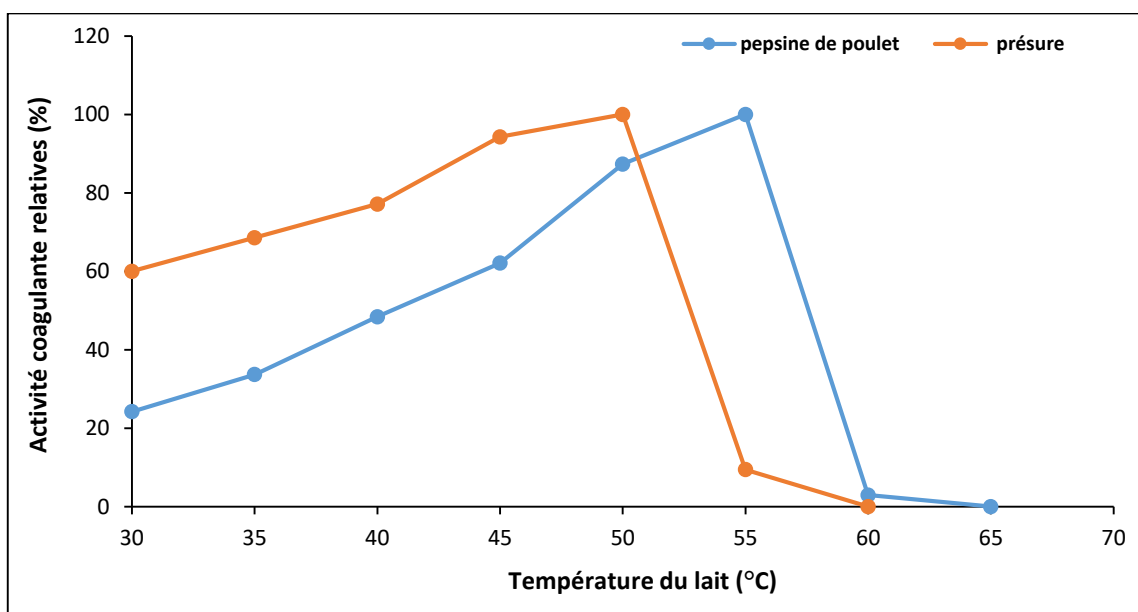


Figure 9 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante

Des résultats similaires ont également été rapportés par Adoui en 2007 et Siar en 2014 concernant l'activité coagulante du lait. Ces auteurs ont indiqué des températures optimales d'action de 55°C pour la pepsine de poulet et de 50 °C pour la présure animale. De plus, l'étude menée par Wang et *al.* en 2023 a rapporté que l'extrait enzymatique de *Bacillus velezensis* YH-1 avait une activité coagulante maximale à 55 °C, une température similaire à celle de la présure commerciale. Cela indique que l'extrait de cette souche bactérienne pourrait avoir un potentiel intéressant dans des applications similaires à celles de la présure utilisée dans l'industrie fromagère. Par ailleurs, Ait Saidi (2022) a indiqué que l'optimum thermique de la pepsine du poulet était de 70°C.

En revanche, selon les travaux de Wu et *al.* en 2013, la présure traditionnelle présente une température optimale comprise entre 40 et 42 °C. De plus, la chymosine, principale enzyme de la présure, se caractérise par une température optimale de coagulation qui se situe entre 35 et 45 °C, avec un optimum à 42 °C. À cette température, un équilibre minéral est atteint, entraînant une augmentation du calcium micellaire chargé positivement, ce qui diminue la stabilité des micelles chargées négativement (Britten et Giroux, 2021). En effet, à des températures inférieures, le temps de coagulation augmente. Les micelles chargées négativement deviennent plus petites et plus nombreuses, avec une prédominance d'ions négatifs qui assure une meilleure stabilité et réduit la floculation. À des températures supérieures, le temps de coagulation augmente également en raison de la dénaturation de l'enzyme.

3.2. Effet du pH sur l'activité coagulante

L'effet du pH sur l'activité de coagulation du lait par la pepsine de poulet et la présure a été déterminé dans une gamme de pH allant de 5 à 8 à une température de 35°C. Les résultats obtenus, illustrés dans la figure 10, montrent une similitude de profil entre les deux extraits étudiés. L'activité maximale est observée à pH 5 pour les deux extraits coagulants. Elle diminue d'abord lentement à pH 5,5 (activité relative de 90,78 %) puis rapidement pour atteindre, à pH 6,5, des activités relatives de 16, 41% et de 20,21 % pour l'extrait pepsique et la présure respectivement. A pH 7, la pepsine perd 97 % de son activité tandis que la présure est totalement inactivée.

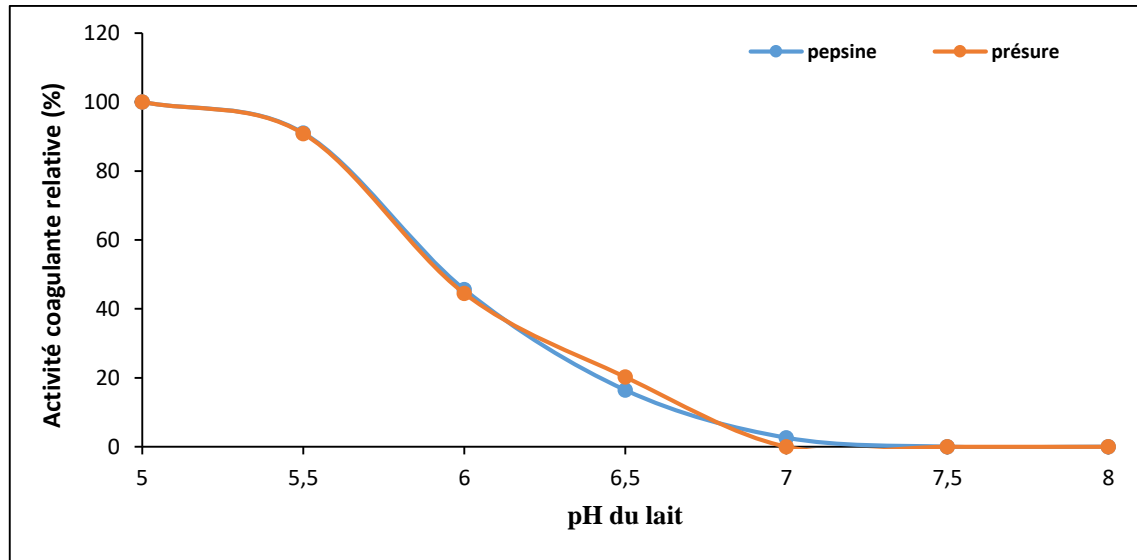


Figure 10 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante

Les résultats obtenus dans cette étude concordent avec ceux rapportés par Yao Zhang (2023), en étudiant l'effet du pH du lait sur l'activité coagulante d'un extrait enzymatique microbien DB219. En outre, Yang et *al.* (2022), le pH optimal de la protéase provenant des larves de tenébrion meunier était de 5,5.

L'acidification affecte le degré de minéralisation des micelles ainsi que l'activité des enzymes de la protéase. Un changement du pH du lait ou l'ajout de divers sels influencent l'équilibre minéral du lait. Avec la diminution du pH, les groupes acido-basiques dans le lait deviennent plus protonés, ce qui provoque la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal pour rétablir l'équilibre. Dans le lait, le phosphate de calcium colloïdal est complètement solubilisé à un pH d'environ 5,2. À un pH plus bas, environ 3,5, le calcium lié directement aux résidus de phosphosérine de la caséine est libéré. Ce calcium libre contribue à renforcer les interactions au sein des micelles de caséine, favorisant ainsi la formation d'un réseau protéique dense nécessaire à la coagulation (Le Graet et Brûlé, 1993).

Les micelles de caséine sont structurées de manière à être chargées négativement, ce qui les maintient en suspension dans le lait en raison de la répulsion électrostatique entre elles. De plus, elles retiennent une quantité significative d'eau autour d'elles. Lorsque le lait s'acidifie, les charges négatives des micelles sont neutralisées, ce qui diminue leur stabilité. Cela entraîne leur agglomération, provoquant ainsi la coagulation du lait, et favorise la solubilisation du calcium et du phosphate de calcium à partir de leur forme insoluble à une forme soluble. Ce processus conduit à la formation d'un caillé mou, une étape cruciale dans la fabrication du fromage et d'autres produits laitiers.

3.3. Effet de la concentration CaCl₂ sur l'activité coagulante

L'influence du chlorure de calcium sur l'activité coagulante de la protéase pepsine de poulet par rapport à la présure animale a été étudiée en faisant varier la concentration de chlorure de calcium dans le lait de 0,01 à 0,1 M.

Les résultats, présentés dans la figure 11, indiquent que l'extrait enzymatique de la pepsine de poulet a atteint son activité coagulante optimale à une concentration de 0,04 M de chlorure de calcium, tandis que la présure animale a atteint son activité maximale à 0,05 M. Au-delà de ces concentrations l'activité diminue.

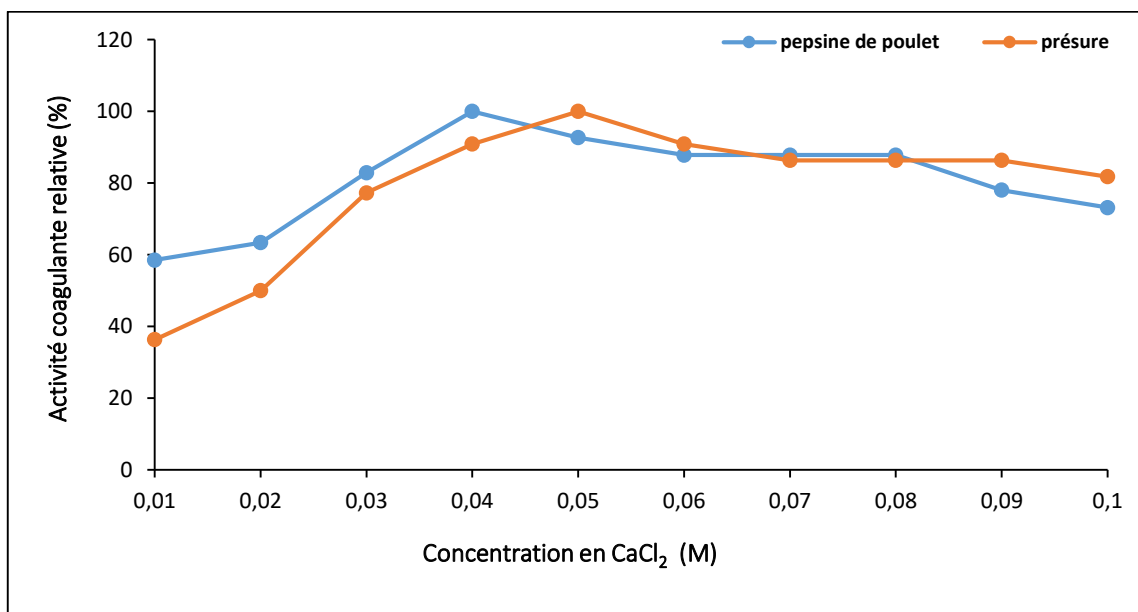


Figure 11 : Effet de la concentration en CaCl₂ du lait sur l'activité coagulante

Les sels du lait, le calcium et le phosphate, jouent un rôle crucial dans la coagulation du lait par la présure ainsi que dans la structure et le processus de tamponnage du fromage. L'ajout de calcium réduit le temps de coagulation du lait par la présure en neutralisant les charges négatives des résidus de caséine, ce qui favorise l'agrégation des micelles coagulées. De plus, l'incorporation de faibles concentrations de calcium renforce également la fermeté du gel résultant de la coagulation (Lucey, 1993). En effet, la majorité du calcium ajouté se lie à la caséine, se fixant soit directement à ses résidus chargés négativement, soit sous forme de complexe caséino-phosphocalcique (CCP). En revanche, l'ajout de concentrations très élevées de calcium diminue significativement la vitesse à laquelle les gels de lait coagulés par la présure deviennent fermes, probablement en raison d'une liaison excessive de calcium qui pourrait perturber la formation appropriée du gel ou réduire la solubilité de la κ -caseine.

Par ailleurs, selon Lucey (1993), l'acidification du lait, sans l'ajout d'agents chélateurs de calcium, augmente l'activité du Ca^{2+} et diminue simultanément la concentration de CCP ainsi que le temps de coagulation par la présure. Dans une étude similaire, Zhang (2023), lors de leur étude sur les coagulants d'origine microbienne, la métalloprotéase de *Bacillus velezensis* DB219 présente une activité coagulante optimale à une concentration de 0,03 M de CaCl_2 , et de 0,04 M pour la présure animale.

3.4. Effet de la concentration en extrait enzymatique

L'activité des protéases coagulantes en fonction de la concentration de l'extrait a été estimée en mesurant le temps de coagulation pour des concentrations variables allant de 70 à 196 mg/ml.

Les résultats obtenus, illustrés dans la figure 12, montrent que l'activité coagulante relative augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration en extraits enzymatiques.

Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en enzyme. Selon Ramet et Weber (1980), La concentration en enzyme dans les limites utilisées en fromagerie influe aussi sur la vitesse de raffermissement du gel.

Selon les propriétés cinétiques de l'enzyme, il peut exister une plage de concentrations de substrat où l'enzyme atteint son activité maximale. Au-delà de cette plage, les vitesses initiales d'activité peuvent ne pas augmenter de manière significative car l'enzyme est déjà opérationnelle à sa capacité maximale (Voet et Voet, 2016).

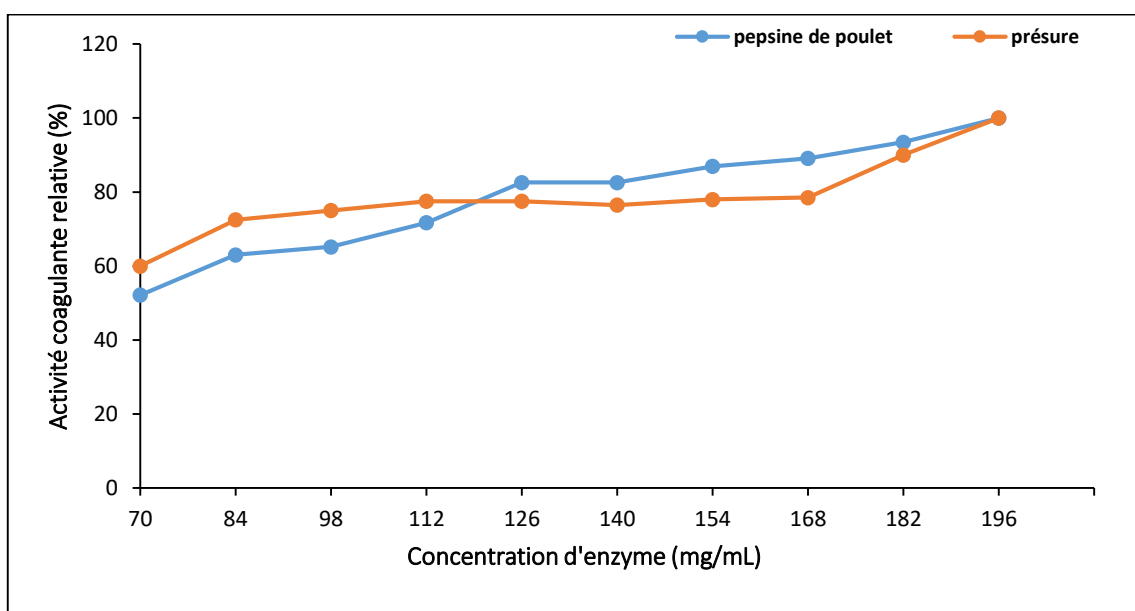


Figure 12 : Effet de la concentration en extrait enzymatique

4. Etude de la stabilité thermique

La stabilité thermique de l'extrait enzymatique et de la présure a été déterminée en les incubant pendant 30 minutes à des températures allant de 30 °C à 70 °C.

Les résultats, présentés dans la figure 13, montrent que les extraits enzymatiques étudiés restent relativement stables entre 30 °C et 35 °C. Au-delà de 35 °C, la pepsine commence à perdre son activité progressivement jusqu'à 50°C. Lorsque les températures dépassent 55 °C, l'activité coagulante de la protéase animale diminue rapidement pour s'annuler à 65 °C. En revanche, l'activité résiduelle de la présure diminue rapidement à partir de 35 °C pour s'annuler à 55 °C.

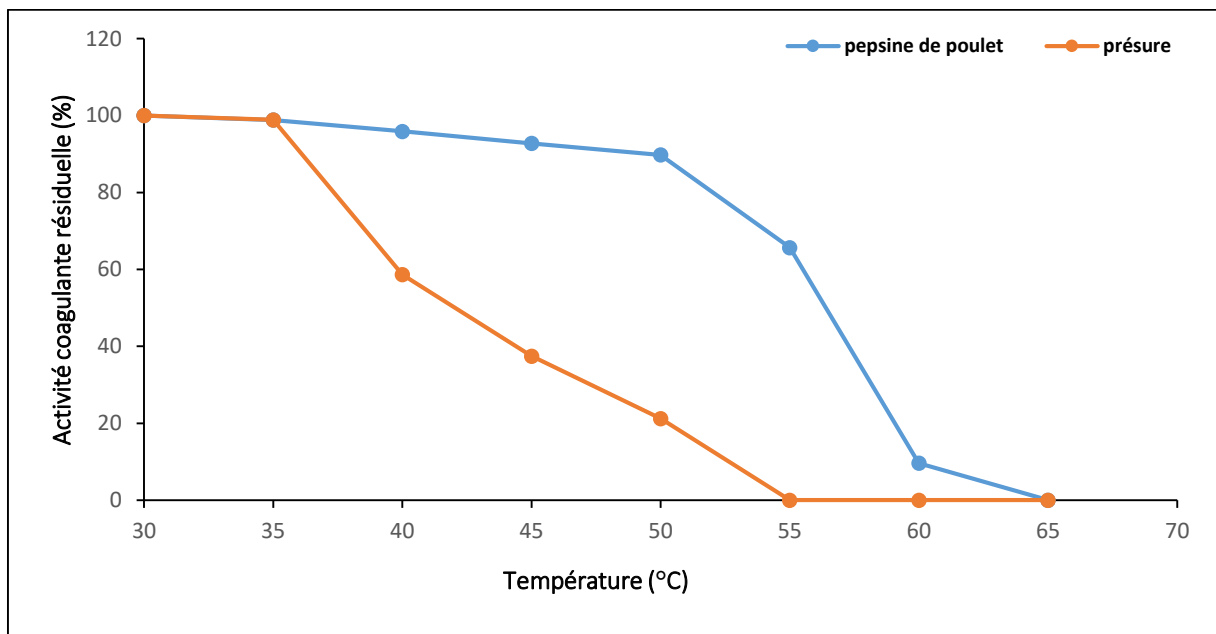


Figure 13 : Stabilité thermique des extraits coagulants

Les enzymes sont utilisées commercialement et industriellement en raison de leur efficacité catalytique et de leur spécificité ; cependant, elles sont naturellement instables en raison de leur structure moléculaire complexe (Iyer et Ananthanarayan, 2008). Ainsi, l'activité et la stabilité des enzymes sont directement liées à leurs applications biocatalytiques (Ó'Fágáin, 2003 ; Siqueira et al., 2014). La stabilité enzymatique se réfère à la capacité de l'enzyme à maintenir son intégrité moléculaire ou sa fonction biologique face à des conditions défavorables.

La température est une variable cruciale pour les processus biocatalytiques, car elle a des effets opposés sur l'activité et la stabilité des enzymes. Une augmentation de la température

accroît l'activité enzymatique jusqu'à un point maximal, au-delà duquel des hausses de température supplémentaires peuvent provoquer la dénaturation et l'inactivation de l'enzyme. Wu et *al.* (2013) ont étudié la stabilité thermique de l'enzyme coagulante produite par *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi, montrant une stabilité thermique à 40 et 50 °C. Selon He et *al.* (2011), l'extrait enzymatique produit par *Bacillus amyloliquefaciens* présente une stabilité thermique jusqu'à 35 °C. Les résultats obtenus par Celebi (2016), ont rapporté une stabilité thermique de la coagulase fongique de *Mucor miehei* entre 35°C et 50°C.

Conclusion

L'objectif de ce présent travail était l'extraction et la caractérisation de la pepsine de poulet.

La démarche adoptée a comporté deux phases distinctes. La première a consisté à la collecte des proventricules de poulet et l'extraction de la pepsine. La seconde phase s'est focalisée sur la détermination des conditions optimales d'action, comparée à celles de la présure traditionnelle. La détermination de l'activité coagulante et de l'activité protéolytique, aussi les activités coagulantes en fonction de la température, du pH, de la concentration en CaCl_2 du lait, de la concentration de l'extrait ainsi que la stabilité de la pepsine a été réalisée.

Les résultats montrent que le rendement d'extraction de la pepsine est estimé à 82,73 % avec une teneur en protéines totales de 68,89 mg/ml. L'extrait enzymatique présente une activité coagulante de 4 UP/ml. Le taux des produits d'hydrolyse de la caséine est estimé à 52,81 $\mu\text{g/ml}$ pour la pepsine et à 48,31 $\mu\text{g/ml}$ pour la présure.

La caractérisation partielle de l'extrait pepsique a montré quelques différences, par comparaison à la présure animale. L'activité coagulante optimale de la pepsine est obtenue à une température de 55°C, à pH 5,5, et avec une concentration en chlorure de calcium du lait de 0,04 M. Enfin, l'extrait de pepsine a montré une stabilité thermique entre 30°C et 35°C.

A la lumière de cette étude, il est possible d'obtenir un extrait coagulant le lait à partir de proventricules de poulet, dont les caractéristiques classiques se rapprochent un peu de celles de la présure traditionnelle. Le proventricule de poulet, sous-produit avicole, constitue une source intéressante des enzymes aptes à coaguler le lait.

En perspective, il serait pertinent d'envisager les études suivantes :

- Amélioration du rendement d'extraction de la pepsine par optimisation des conditions de son obtention ;
- Purification de l'extrait enzymatique brut en vue de diminuer son activité protéolytique ;
- Détermination des condition optimales d'action de l'enzyme purifiée ;
- Essai de fabrication de fromage avec la pepsine de poulet accompagné d'une étude comparative de la qualité des produits finis ;
- Etude socio-économique de production de l'agent coagulant.

Références bibliographiques

A

- Adoui F. (2007).** Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir des proventricules de poulet. Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine, 64 p.
- Ait Saidi K., Aguenihanai N. et Boukhalfa F. (2022).** Recherche des succédanés de la présure d'origine animale et Végétale (poulet Et Camomille). Mémoire de Master, Université de Bejaia, 35p.
- Alais C. (1984).** Sciences du lait. Principe des techniques laitières. Ed. Sepaic, Paris, 4^{ème} Ed., 68p.
- Amaro-Hernández J. C., Olivas G. I., Acosta-Muñiz C. H., Gutiérrez-Méndez N., Rios-Velasco C. et Sepulveda D. R. (2022).** Chemical interactions among caseins during rennet coagulation of milk. *Journal of Dairy Science* 105(2) : 981-989.
- Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P. et Simpson R. (2002).** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. Science et technologie du lait, 1-74.
- Anonyme (1991).** Chymosin : Production from genetically engineered micro-organisms. *Biotechnological Innovations in Food Processing* : 113–144.

B

- Bansal N., Fox P. F. et McSweeney P. L. H. (2007).** Aggregation of rennet-altered casein micelles at low temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 : 3120–3126.
- Bauland J., Famelart M. H., Bouhallab S., Jeantet R., Roustel S., Faiveley M. et Croguennec T. (2020).** Addition of calcium and magnesium chlorides as simple means of varying bound and precipitated minerals in casein micelle: Effect on enzymatic coagulation.
- Baumgartner W. (2021).** Rennet substitutes and their effects on cheese quality. *Food Research International* 149 : 110704.
- Berridge N. J. (1945).** The purification and crystallization of rennin. *Biochemical Journal* 39(2) : 179–186.
- Bohak Z. (1969).** Purification and characterisation of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *Journal of Biological Chemistry* 244(17) : 4638-4648.
- Bohak Z. (1970).** Chicken pepsinogen and chicken pepsin. In: Methods in enzymology, proteolytic enzymes. Coord. Perlmann G. E. and Lorand L., Acad. Press Inc., New York, Vol. 19, pp. 347–358.
- 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.

Britten M. et Giroux H. J. (2021). Rennet coagulation of heated milk. *International Dairy Journal* 124 : 105–179.

C

Celebi M., Topuzogullari M. et Kuzu H. (2016). Thermal destabilization of *Rhizomucor miehei* rennet with aldehyde dextran sulfate : purification, bioconjugation and milk-clotting activities. *Applied biochemistry and biotechnology* 180 : 261-273.

Corredig M. et Salvatore M. (2016). Enzymatic coagulation of milk. In : *Advanced Dairy Chemistry Vol. 1B. Proteins: Applied Aspects.* Coord. McSweeney P. L. H. et O'Mahony J. A. Ed. Springer, New York, NY, USA, pp. 287–307.

Corredig M. et Salvatore E. (2016). Advances in dairy protein functionality. *International Dairy Journal* 56(2) : 123-130.

Croguennec T. et Horne D. S. (2008). Structural changes in casein micelles during cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 91(4): 1534-1542.

D

Dalgleish D. G. (1997). The enzymatic coagulation of milk. In: *Advances in Dairy Chemistry: Proteins.* Coord. Fox P. F., Ed. Blackie and Son Ltd, Scotland. pp.135-142.

Dalgleish D. G. et Corredig M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology* 3 : 449–467.

Danley D. E. et Geoghegan K. F. (1988). Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin C. *Journal of Biological Chemistry* 263(20) : 9785-9789.

F

Fox P. F., McSweeney P. L. H. (2015). The role of calcium in cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science* 98(2) : 843-854.

Fox P. F. et McSweeney P. L. H. (2017). Cheese: An overview. In : *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology; General Aspects.* Coord. McSweeney P. L. H., Fox P. F., Cotter P. D. et Everett D. W. 4th ed. Elsevier, San Diego, USA, pp. 5–21.

Fredot M. (2005). Advances in enzyme applications in food processing. *Journal of Food Science* 70(4) : 150-158.

G

Gaucheron F. (2005). The minerals of milk. *Reproduction Nutrition. Development* 45 : 473–483.

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

Green M. L. (1977). Milk coagulants. *Journal of Dairy Research* 44(01) : 159-188.

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

Gaillard, O. (2003). La trypsine (TIR). *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 5(18), 254-255.

H

Haard N. F. (1992). A Review of Proteolytic Enzymes from Marine Organisms and Their Application in the Food Industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 1(1) : 17–35.

He X., Ren F., Guo H., Zhang W., Song X. et Gan B. (2011). Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4. *Korean Journal of Chemical Engineering* 28: 203-208.

Hidjo A. et Kone S. (2018). Evaluation of enzymatic activity in dairy applications. *International Dairy Journal* 85(2) : 234-241.

Holt C. (2004). An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. *European Biophysics Journal* 33 : 421-434.

Horne D. S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current opinion in colloid & interface science* 11(2-3) : 148-153.

Horne D. S. et Lucey J. A. (2017). Rennet-induced coagulation of milk. *Cheese*, 115-143.

I

Iyer P. V. et Ananthanarayan L. (2008). Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment. *Process biochemistry* 43(10) : 1019-1032.

K

Klomklao S., Kishimura H., Yabe M. et Benjakul S. (2007). Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 147(4) : 682-689.

L

Lefebvre-Cases M. et Martin J. (1998). Effect of enzyme concentration on cheese texture. *Journal of Dairy Research* 65(3) : 223-230.

Le Graet Y. et Brulé G. (1993). Les équilibres minéraux du lait: influence du pH et de la force ionique. *Le lait* 73(1) : 51-60.

Leite Júnior B. R. D. C, Tribst A. A. L. et Cristianini M. (2015). Influence of high pressure homogenization on commercial protease from *Rhizomucor miehei*: Effects on proteolytic and milk-clotting activities. *LWT-Food Science and Technology* 63(1) : 739-744.

Liu X., Wu Y., Guan R., Jia G., Ma Y. et Zhang Y. (2021). Advances in research on calf rennet substitutes and their effects on cheese quality. *Food Research International* 149 :110704.

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.I. et Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Follin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 : 265- 275.

Lucey J. A. et Fox P. F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture : A review. *Journal of dairy science* 76(6) : 1714-1724.

Luquet F.M. (1985). Lait et produits laitiers. Vache. Brebis. Chèvre. T2. Ed. Tech. et Doc. Lavoisier, Paris.

M

Martin P. (1984). Influence du degré de phosphorylation de la pepsine A bovine sur son activité enzymatique. *Biochimie* 66(5) : 371-384.

McSweeney P. L. H. (2007). Conversion of milk to curd. In : Cheese Problems Solved. Coord. Lucey J. et McSweeney L. Woodhead Publishing, UK, pp. 50–71.

Morsli A. (1997). Recherches sur les activités protéasiques de l'extrait de *Cynara scolymus*, du latex de *Ficus carica* et de proventricules de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Mémoire de Magister. Sciences Agronomiques. I.N.A. El-Harrach.

Muñoz M., Fernández D., Fresno J. M. et Delgado D. (2023). Effect of high hydrostatic pressure processing on the rennet coagulation kinetics and physicochemical properties of sheep milk rennet-induced gels. *Journal of Dairy Science* 106(4) : 2314-2325.

N

Nalinanon S., Benjakul S. et Kishimura H. (2010). Purification and biochemical properties of pepsins from the stomach of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *European Food Research and Technology* 231 : 259-269.

Noblet B. (2012). Le lait: produits, composition et consommation en France. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 47(5) : 242-249.

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

O

Ó'Fágáin C. (2003). Enzyme stabilization—recent experimental progress. *Enzyme and microbial technology* 33(2-3) :137-149.

P

Páez de León, L., et Pinzón G. (1995). Purification and assay of chicken pepsin. *Acta Científica Venezolana* 46(4) : 237-241.

R

Ramet J.P. et Weber F. (1980). Contribution à l'étude de l'influence des facteurs du milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Lait* 60 (591- 592) : 1-13.

Rodrigues I. et Pereira M. (2018). The role of microbial enzymes in dairy coagulation. *Journal of Dairy Science* 101(5) : 3456-3464.

S

Sandra S., Alexander M. et Dalgleish D. G. (2007). The rennet coagulation mechanism of skim milk as observed by transmission diffusing wave spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* 308 : 364–373.

Sandra S., Ho M., Alexander M. et Corredig M. (2012). Effect of soluble calcium on the renneting properties of casein micelles as measured by rheology and diffusing wave spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 95 : 75–82.

Siar J. (2014). Study of enzyme activity in milk coagulation. *Food Science Journal* 27(4) : 512-520.

Siqueira F., Facchin S., Horta C. C. R., Victória J. M. N. et Kalapothakis E. (2014). Survey of microbial enzymes in soil, water, and plant microenvironments. *The open microbiology journal* 8 : 25– 30.

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

V

Vioque M., Gomez R., Sanchez E., Mata C., Tajada L. et Fernandez-salguero J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of Ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara condunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 48 : 451 – 456.

Voet et Voet (2016). Biochimie (3^{ème} Ed. De Boeck Supérieur.

W

Wang Y., Aziz T., Hu G., Liu J., Min Z., Zhennai Y. et Alasmari A. F. (2023). Production, purification, and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase produced by *Bacillus velezensis* YH-1 isolated from traditional Jiuqu. *Lwt* 184 : 115080.

Wehaidy H. R., Abdel-Naby M. A., Kholif A. M., Elaaser M., Bahgaat W. K. et Wahab W. A. A. (2023). The catalytic and kinetic characterization of *Bacillus subtilis* MK775302 milk

clotting enzyme : comparison with calf rennet as a coagulant in white soft cheese manufacture. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 21(1), 61-70.

Wu F. C., Chang C. W. et Shih I. L. (2013). Optimization of the production and characterization of milk clotting enzymes by *Bacillus subtilis* natto. *SpringerPlus* 2(1) 33-42.

X

Yang X., Zhang Z., Zhang W., Qiao H., Wen P. et Zhang Y. (2022). Proteomic analysis, purification and characterization of a new milk-clotting protease from *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Functional Foods* 89 : 104944.

Z

Zhang Y., Hu, J., Wang J., Liu C., Liu X., Sun J. et Wu Y. (2023). Purification and characteristics of a novel milk-clotting metalloprotease from *Bacillus velezensis* DB219. *Journal of Dairy Science*, 106(10) : 6688-6700.

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

Annexes

Annexe I

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

➤ **Préparations des solutions**

- Solution (A) : Dissoudre 1 g de NaOH dans 250 ml d'eau distillée, puis ajouter 5 g de Na₂CO₃.
- Solution (B) : Dissoudre 0,1 g de tartrate de sodium-potassium dans 10 ml d'eau, puis ajouter 0,032 g de CuSO₄.
- Solution (C) : Mélanger 50 ml de la solution (A) avec 1 ml de la solution (B). Ce mélange doit être préparé juste avant utilisation.
- Réactif (D) : Préparer une solution de réactif de Folin diluée au 1/2.

➤ **Courbe d'étalonnage de la tyrosine**

✓ **Préparation d la gamme d'étalonnage de la tyrosine**

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

➤ **Conditions d'hydrolyse :**

- Ajouter 1 ml de solution enzymatique à 1 ml de solution de caséine à 2 % (P/V) préparée dans un tampon citrate de sodium à pH 5,2.
- Incuber le mélange pendant 20 minutes à 35°C.
- Ajouter 5 ml d'acide trichloroacétique (T.C.A.) à 12 % (P/V) pour arrêter la réaction.
- Laisser reposer pendant 15 minutes.
- Filtrer la solution à l'aide de papier filtre.

✓ Préparation de l'échantillon

- Prendre 1 ml du filtrat obtenu et y ajouter 5 ml de la solution (C), puis bien mélanger.
- Incuber le mélange pendant 10 minutes à 35°C.
- Ajouter ensuite 0,5 ml de la solution (D) dans chaque tube et agiter immédiatement.
- Incuber à 35°C pendant 20 minutes.

Préparation du blanc :

- À 1 ml de solution caséinique, ajouter 5 ml de T.C.A. à 12 %, puis compléter en ajoutant 1 ml de solution enzymatique.

▪ Lecture de l'absorbance

- Mesurer l'absorbance à 660 nm après avoir étalonné le spectrophotomètre avec le témoin.

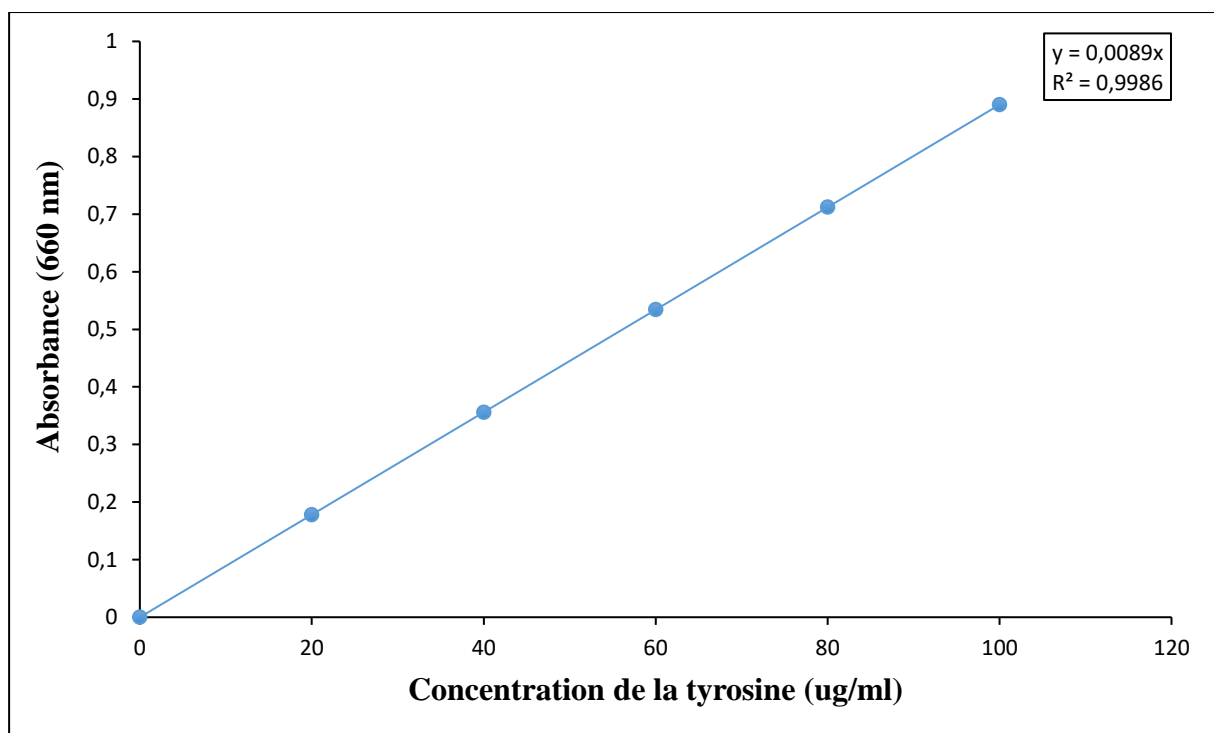


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine

Annexe II Dosage des protéines (Bradford, 1976)

➤ Préparation du réactif de Bradford

- Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie G-250 dans 50 ml d'éthanol à 95 %.
- Ajouter 100 ml d'acide phosphorique à 85 %.
- Compléter le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée.
- Conserver ce réactif à 4°C et à l'abri de la lumière.

➤ Courbe d'étalonnage de la BSA

Une gamme d'étalons est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) à une concentration de 100 µg/ml, avec les concentrations suivantes : 0, 20, 40, 60, 80 et 100 µg/ml.

A 1ml de chaque dilution sont ajoutés 5 ml du réactif de Bradford suivi d'une forte agitation.

➤ Lecture de l'absorbance

Les échantillons sont laissés à l'obscurité pendant 5 minutes, puis l'absorbance est mesurée à 595 nm.

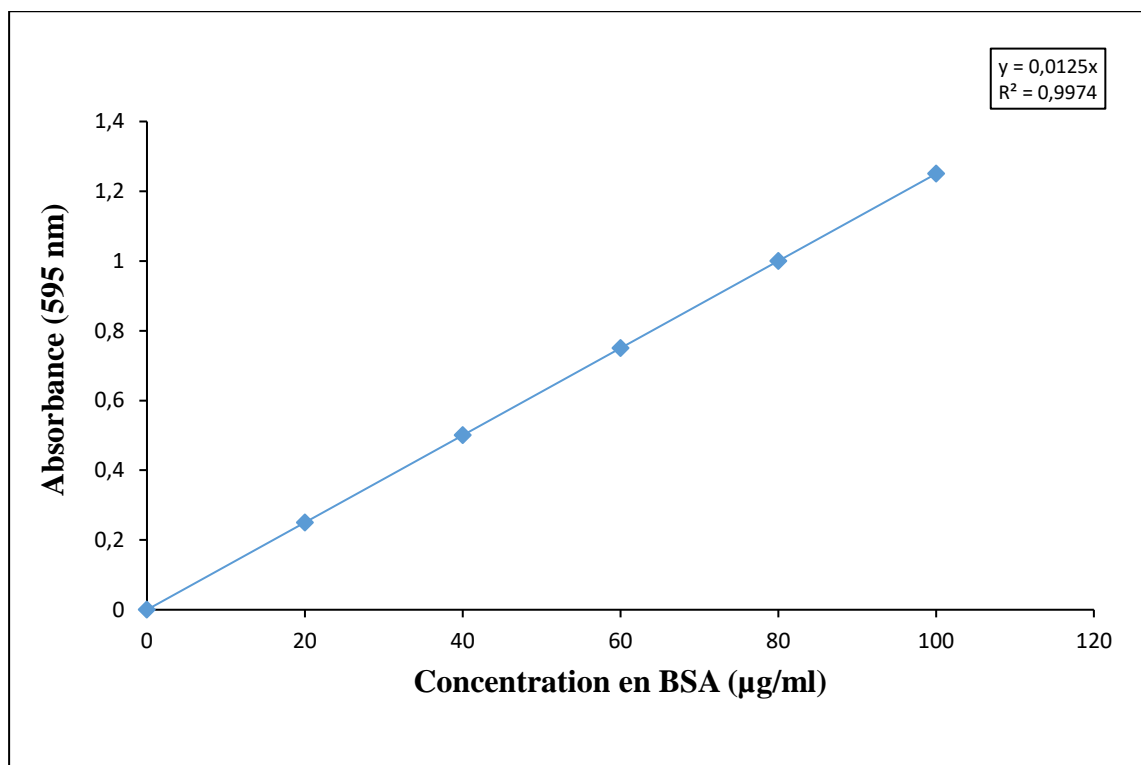


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la B.S.A.

Résumé

L'objectif de ce travail est la contribution à l'étude d'un succédané de la présure par la pepsine de poulet comme agent coagulant du lait.

L'obtention de la pepsine de poulet a été réalisé par macération de proventricule de poulet (*Gallus gallus*). Le rendement d'extraction est estimé à 82,73 %. L'extrait brut se caractérise par une activité coagulante de l'ordre de 4 UP/ml, une concentration en protéines de 68,89 mg/ml et une activité protéolytique de 52,81 µg/ml.

Les conditions optimales de l'activité coagulante ont été déterminées. L'activité est maximale à pH de 5,5 à une température de 55 °C et pour une concentration en CaCl₂ de lait de 0,04 M. La pepsine de poulet est relativement stable entre 30°C et 35°C après 30 minutes d'incubation.

En général, ces propriétés sont similaires à celles de la présure d'origine animale, à l'exception des conditions de température.

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

Abstract

The aim of this work is to contribute to the study of a rennet substitute using chicken pepsin as a milk coagulant.

Chicken pepsin was obtained by maceration of chicken (*Gallus gallus*) proventriculus. The extraction yield was estimated at 82.73%. The enzymatic extract is characterized by a clotting activity of around 4 UP/ml, a protein concentration of 68.89 mg/ml and a proteolytic activity of 52.81 µg/ml.

The optimal conditions for clotting activity were determined. The activity is maximal at a pH of 5.5, a temperature of 55°C, and for a milk CaCl₂ concentration of 0.04 M. Chicken pepsin is relatively stable between 30°C and 35°C after 30 minutes incubation period.

In general, these properties are similar to those of animal rennet, with the exception of the temperature conditions.

Keywords: chicken pepsin, proventriculus, milk-clotting, rennet, characterization.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو المساهمة في دراسة بديل للمنفعة باستخدام البيسين المستخرج من الدجاج كعامل لتخثر الحليب. تم الحصول على بييسين الدجاج عن طريق نقع معدة الدجاج (*Gallus gallus*). تم تقدير نسبة الاستخلاص بـ 82.73 %. يتميز المستخلص الإنزيمي بنشاط تخثري يبلغ حوالي 4 وحدات تخثر/مل، بتركيز بروتين قدره 68.89 ملغ/مل، ونشاط محلل للبروتينات يصل إلى 52.81 مكغ/مل.

تم تحديد الظروف المثلى للنشاط التخثري، حيث يكون النشاط في أقصاه عند درجة حموضة 5.5 ودرجة حرارة 55 مئوية، وتركيز كلوريد الكالسيوم في الحليب 0.04 مول. يتمتع البيسين المستخرج من الدجاج باستقرار نسبي بين 30°م و35°م بعد 30 دقيقة.

بشكل عام، تتشابه هذه الخصائص مع خصائص النفعة ذات الأصل الحيواني، باستثناء درجة الحرارة.

الكلمات المفتاحية: بييسين الدجاج، معدة الدجاج، تخثر الحليب، النفعة، التمييز