

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

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



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

MASTER

Thème

Extraction et caractérisation d'un succédané
végétal de la présure obtenu à partir des graines
de la citrouille *Cucurbita pepo*

Présenté par :

ZAIDI SOUAD & CHEURFAOUI ZOUBIR

Soutenu le : **17 septembre 2020**

Devant le jury composé de :

Mme OUKIL NAIMA	MCA	Présidente
Mr BOUKHALFA FARID	MCA	Encadreur
Mr MOKRANI ABDERRAHMANE	MCA	Examineur

Année universitaire : 2019 / 2020

Remerciements

Avant tout nous remercions « ALLAH » le tous puissant, de nous avoir ouvert les portes du savoir et qui sans lui ce travail ne serait jamais réalisé.

Nous tenons à exprimer nos essentiels remerciements à nos parents pour leur éternel et inconditionnel soutien, toujours présents de notre naissance à ce jour.

Nos grands remerciements à Mr **BOUKHALFA FARID**, notre encadreur pour sa générosité et l'aide nécessaire qu'il nous a apportées et nous a dirigé dans ce travail et qui nous a prodigué de ses conseils et ses orientations.

Notre profonde gratitude aux membres du jury qui vont juger ce travail.

Madame **OUKIL NAIMA** , présidente de ce jury

Monsieur **MOKRANI ABDERRAHMANE**, examinateur

Enfin, que tous ceux, de loin comme de près, ont contribué à l'élaboration de ce mémoire trouvent ici l'expression de nos remerciements.

**ZAIDI SOUAD
CHEURFAOUI ZOUBIR**

Sommaire

Sommaire	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Synthèse bibliographique : Généralités

I- Le lait	2
I-1 Composition du lait	2
I-2 Protéines	6
1-Caséines	6
2-Protéine de lactosérum	6
I-3 Structure des caseines	7
I-3.1 Caseine k.....	8
I-4 Succédanés de présure	8
I-4.1 Succédanés de présure d'origine animale.....	9
I-4.2 Succédanés de présure d'origine végétale	10
I-4.3 Succédanée de présure d'origine microbienne	10
I-5 Coagulation du lait.....	11
I-5.1 Type de coagulation.....	11
I-5.2 Mécanisme de coagulation	12
II-Enzymes coagulants le lait:	14
II-1 Présure	14
II-2 Chymosine.....	14
II-3 Pepsine	16
III-Présentation du citrouille (<i>Cucurbita Pepo</i>)	17
III-1 Origine de la plante	17
III-2 Systématique	18

III-3 Utilisations et valeur nutritive.....	18
IV- Fromage	19
IV-1 Technologie de la fabrication du fromage	19

Partie expérimental : Matériel et méthode

I-Matériel végétale	21
II-Characterisation physico-chimique de l'extrait brut	21
II-1 Mesure de la teneur en matière sèche.....	21
II-2 Mesure de Ph	22
II-3 Teneur en protéines	22
III-Mesure de l'activité enzymatique	22
III-1 Détermination de l'activité protéolytique	23
III-2 Evaluation de l'extrait coagulant	24
IV- Détermination des conditions optimales de l'activité coagulantes.....	26
IV-1 Effet de température sur l'activité coagulante	26
IV-2 Effet de PH sur l'activité coagulante	26
IV-3 Effet de la concentration de CaCL ₂ sur l'activité coagulante	26
IV-4 Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique.....	27

Partie expérimental : Résultats et discussion

I-Characterisation physico chimique de l'enzyme	28
I-1 Dosage des protéines de l'extrait enzymatique	28
I-2 Mesure de l'activité protéolytique de l'enzyme	29
I-3 Activité coagulante	29
II-Détermination des conditions optimales de l'activité enzymatique de l'extrait étudié ...	30
II-1 Effet de la température sur l'activité coagulante.....	30
II-2 Effet de PH sur l'activité coagulante.....	31
II-3 Effet de concentration de CaCL ₂ sur l'activité coagulante.....	33
II-4 Effet de concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique	34
Conclusion.....	37

Liste des illustrations

Liste des figures

Figure 1 modèle de micelle de caséine avec sous unités κ	7
Figure 2 Phases du processus de coagulation enzymatique du lait..	13
Figure 3 Représentation schématique des structures secondaires et tertiaires de la chymosine, montrant la fente du site actif dans laquelle s'insère la séquence comprenant les résidus d'acides aminés 102-108 de la caséine κ ((a) de b).....	15
Figure 4 Structure schématique de la pepsine..	16
Figure 5 Variations de fruits de citrouille (<i>Cucurbita pepo</i>).....	18
Figure 6 photographie des graines de la citrouille <i>Cucurbita pepo</i> ..	21
Figure 7 Effet de la température sur l'activité de coagulante de l'extrait enzymatique étudié	30
Figure 8 Effet de pH sur l'activité de coagulante des extraits enzymatiques étudiés.	32
Figure 9 Effet de la concentration en CaCl_2 sur l'activité de coagulante de l'extrait enzymatique étudié.....	33
Figure 10 Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique étudié.....	35

Liste des illustrations

Liste des tableaux

Tableau I : Composition moyenne du lait selon les espèces (g/l).....	2
Tableau II : Composition minérale du lait de vache.....	4
Tableau III : Teneur moyenne des principales vitamines du lait.	5
Tableau IV: Caractérisation physico-chimiques et activité enzymatique de l'extrait enzymatique brut de la <i>Cucurbiata Pepo</i> étudié.	28

Liste des illustrations

Liste des abréviations

BSA : Bovin Sérum Albumine

CaCl₂ : Chlorure de calcium.

CMP: Caséinomacropéptide

CuSO₄: Le sulfate de cuivre

EST: Extrait sec total

F : Force coagulante

FAO: Food and Agriculture Organization

H (%) : Humidité

MS : matière sèche

TCA : Tri Chloroacetic Acid

U.A.C : Unité d'Activité Coagulante

U.P : Unité Présure

Introduction

Résultats et discussion

Matériel et méthode

Introduction

Le lait a toujours été primordial dans l'alimentation des jeunes mammifères et particulièrement des nouveaux-nés. Il reste aujourd'hui encore un élément central dans la nourriture des êtres humains. Son rôle premier est l'apport de nutriments et notamment de protéines tout au long de la vie à travers l'ensemble des produits laitiers. La découverte de la coagulation du lait a ainsi permis de transformer les excédents de divers traites et de pouvoir conserver cet aliment pour une consommation différée (Jean-Claude., 2015).

Le fromage a toujours été une valeur importante de l'alimentation humaine. C'est le résultat d'une transformation du lait par coagulation enzymatique ; source précieuse de protéines, le fromage a été l'un des premiers moyens de conservation du lait, matière première rapidement périssable. Cependant, la coagulation du lait et l'égouttage du caillé qui en résulte n'offrent qu'une stabilité relative et variable selon les fromages qui sont des produits laitiers « vivants ». Ainsi, si la protéolyse est un phénomène fondamental lors de l'affinage, cette activité enzymatique se poursuit même à basse température et conduit au-delà d'un certain stade à une altération du fromage (Lambert., 1988).

La présure est un coagulant du lait d'origine animale extrait de la caillette de jeunes ruminants, elle est composée de deux enzymes la chymosine et la pepsine c'est la plus employée pour la coagulation du lait nécessaire à la fabrication des fromages (Chandan Ramesh.C., 2014).

L'enzyme protéase est un ingrédient clé de la coagulation du lait pendant la technologie de fabrication du fromage ce dernier est en crise en face à l'approvisionnement en présure animale cela a incité de nombreux scientifiques et chercheurs à trouver de nouvelles solutions et sources pour les enzymes de coagulation en particulier les enzymes végétales.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'obtention d'extrait à effet coagulant à partir d'une plante très répandue dans notre pays : graines de la citrouille (*Cucurbita pepo*).

Notre objectif dans ce travail est extraction et caractérisation de l'extrait brut de la citrouille et la recherche des conditions optimales de son activité coagulante et protéolytique.

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.

Introduction

Synthèse bibliographique

I- Le lait

Le lait est 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 en outre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présenter toutes les garanties sanitaires (Alais., 1984).

Le lait est un aliment de couleur blanchâtre produit par les cellules sécrétrices des glandes mammaires des espèces femelles (Vilain Anne-christine., 2010).

I-1 Composition du lait

Le lait de chaque espèce de mammifères est particulièrement adapté aux besoins du nourrisson ; sa composition et ses caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces, et même selon les races, et selon le stade de lactation pour s'adapter aux besoins (Tableau I) (Vilain Anne-christine., 2010).

Tableau I : Composition moyenne du lait selon les espèces (g/l).

	Eau	Lipides	Protéines			Glucide (lactose)	Matières minérales
			Totales	Caséine	Albumine		
Lait maternel	905	35	12-14	10-12	4-6	65-70	3
Vache	900	35-40	30-35	27-30	3-4	45-50	8-10
Chèvre	900	40-45	35-40	30-35	6-8	40-45	8-10
Brebis	860	70-75	55-60	45-50	8-10	45-50	10-12
Jument	925	10-15	20-22	10-12	7-10	60-65	3-5
Bufflonne	850	70-75	45-50	35-40	8-10	45-50	8-10
Ânesse	925	10-15	20-22	10-12	9-10	60-65	4-5
Renne	675	160-200	100-105	80-85	18-20	25-50	15-20

a) Eau

C'est l'élément le plus quantitativement important. Elle conditionne l'état physique des autres constituants, en intervenant dans l'émulsion de la matière grasse et la dispersion des micelles de caséines lors de la transformation. (75 à 80%) de cette eau se retrouve dans le lactosérum de plus l'eau intervient dans le développement bactérien et les altérations du lait (Mahaut *et al.*, 2003).

b) Lipides

Les lipides sont constitués d'un mélange d'acides gras en suspension dans le lait sous forme de gouttelettes, ils forment une émulsion. Ils constituent la partie la plus variable du lait ; leur concentration varie de 10 à 500 g/l suivant les espèces. Ils sont constitués à 99 % de triglycérides (Vilain Anne-christine., 2010).

c) Glucides

Ils sont représentés à 97 % par le lactose, disaccharide composé d'une molécule de galactose et d'une molécule de glucose reliées entre elles par une liaison osidique β (1-4) son pouvoir sucrant est faible (Vilain Anne-christine., 2010).

Le lait contient une cinquantaine d'oligosaccharides bien répertoriés présents à l'état libre, mais en quantités souvent négligeables (0,1 g/litre) (FAO., 2002).

d) Minéraux

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

Les éléments basiques majeurs comme le calcium, le potassium, le magnésium et le sodium forment des sels avec les constituants acides qui sont les protéines, les citrates, les phosphates et les chlorures (**Tableau II**) (Amiot *et al.*, 2002).

Tableau II : Composition minéral du lait de vache (Jeantet et al.,2007)

Eléments minéraux	Concentration (mg.kg)
Calcium	1043-1283
Magnésium	97-146
Phosphate inorganique	1805-2185
Citrate	1323-2079
Sodium	391-644
Potassium	1212-1681
Chlorure	772-1207

e) Vitamines

Selon Vignola.(2002),les vitamines sont des substances biologiquement indispensables à la vie puisqu'elles participent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires. L'organisme humain n'est pas capable de les synthétiser.

On distingue d'une part les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) en quantités constantes, et d'autres part les vitamines liposolubles (A,D,E et K) en quantités variables dépendant de facteurs exogènes (race, alimentation, radiations solaires, ct) (**Tableau III**) (Romain jeantet et al., 2008).

Tableau III : Teneur moyenne des principales vitamines du lait (Debry., 2001)

Vitamines	Teneur moyenne ($\mu\text{g/ml}$)
Vitamines liposolubles	
Vitamine A (+ carotènes)	40 μg /100ml
Vitamine D	2,4 μg /100ml
Vitamine E	100 μg /100ml
Vitamine K	5 μg /100ml
Vitamines hydrosolubles	
Vitamine C (acide ascorbique)	2/ μg 100ml
Vitamine B1 (thiamine)	45 μg /100ml
Vitamine B2 (riboflavine)	175 μg /100ml
Vitamine B6 (pyridoxine)	50 μg /100ml
Vitamine B12 (cyanocobalamine)	0,45 μg /100ml
Niacine et niacinamide	90 μg /100ml
Acide pantothénique	350 μg /100ml
Acide folique	5,5 μg /100ml
Vitamine H (biotine)	3,5 μg /100ml

f) Enzymes

Leurs nombre est important : plus de 60 ; leur qualité et leur grande activité sont responsables d'importantes modification du lait. Elles ont pour origine la sécrétion par les tissus mammaire ou la sécrétion par les microorganismes .Leur activité dépend du pH et de la température. Elles sont détruites en général à 70°C (Veirling., 2008).

Protéases peptones

Certaines, obtenues sous l'action de protéases, seraient constituées de fragments de caséines β et de glycoprotéines analogues à la membrane entourant les globules gras. Elles possèdent une forte activité de surface utilisée en industrie fromagère. Ces protéases peptones donnent une partie du goût du gouda et des fromages à pâte dure (Veiriling., 2008).

g) protéines

Les protéines sont des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules vivantes et constituent une part importante du lait et des produits laitiers (Amiot *et al.*, 2002).

Parmi les protéines on distingue essentiellement les caséines, les protéines du lactosérum et les protéases peptones (Vetier *et al.*, 2000).

1 Protéines du lactosérum

Elles représentent 17 % de la matière azotée. Elles se retrouvent dans le lactosérum et sont qualifiées de solubles parce qu'elles ne précipitent pas au pHi de la caséine entière. Les deux principales protéines du lactosérum sont l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline.

Elles sont les plus immunogènes et leur composition en acides aminés est très différente de celle des caséines en ce qu'elles contiennent moins d'acide glutamique et proline mais sont plus riches en acides soufrés (Ramet *et Weber.*, 1980).

Le lactosérum renferme également des protéases-peptones qui sont des substances glycoprotéiques peu abondantes dans le lait (Vetier *et al.*, 2000).

2 Caséines

Les caséines forment près de 80% de toutes les protéines présentes dans le lait ; leur pH isoélectrique moyen est de 4,65 .

L'élucidation de la structure tridimensionnelle permet d'affirmer que les caséines se regroupent sous forme sphérique appelées micelles.

La taille des micelles se situe entre 100 et 500nm, avec un diamètre moyen près de 180nm, et elle varie principalement selon l'espèce animale, la saison, le stade de lactation (Figure1) (Amiot *et al.*., 2002).

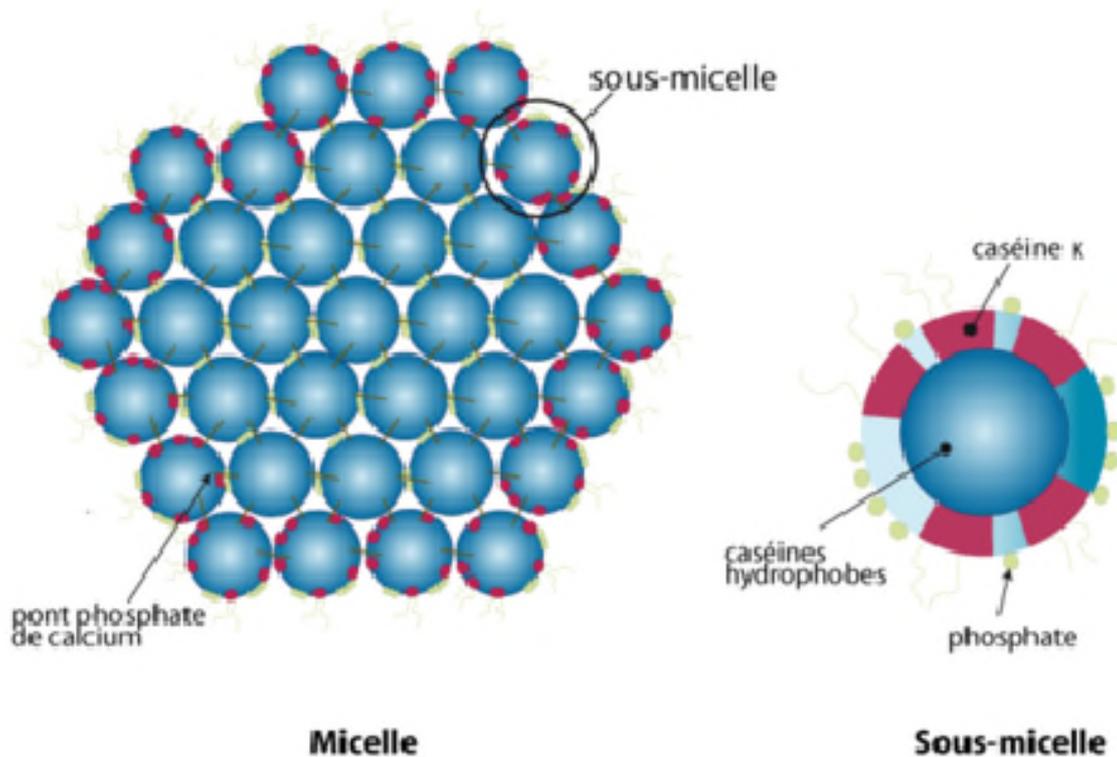


Figure N°1 : modèle de micelle de caséine avec sous unités κ (Amiot et al., 2002)

2-1 Structure des Caséines

Les micelles de caséines sont constituées de 92% de protéines et de 8% minéraux. Différents modèles structuraux de micelles ont été proposés et il semble clair que les micelles sont formées de sous-micelles reliées ensemble par des ponts phosphate de calcium.

Les sous-micelles périphériques sont plus hydrophiles et contiennent une plus grande proportion de κ -caséine (Amiot et al., 2002).

La constitution de la micelle de caséine est différente au centre et en périphérie. Les caséines β et α_1 sont plus présentes au centre de la micelle et forment le cœur hydrophobe, tandis que la partie externe de la micelle est formée de caséines α_1 , α_2 et κ (Amiot et al., 2002).

2-1-1 Caséine k

Une grande majorité de cette caséine (nomenclature du variant B:K-CN B-1P) se trouve à la surface de la micelle, accessible à la présure.

Il s'agit d'une protéine de 169 acides aminés, phosphorylée (ser149) comportant 2 variants génétiques A et B (A:Thr en 136*et B : Asp en 148*).

Elle comporte un constituant majeur non glycosylé et des constituants ,mineurs glycosylés dont la structure précise est élucidée.

Les principaux oligosaccharides sont l'acide N-acétylneuraminique,le galactose et la N-acétyl-galactosamine (Eigel *et al.*, 1984)

Cette caséine est insensible au calcium et stabilise les autres caséines phosphorylées vis-à-vis de ce cation.la coagulation du lait se fait suite à la protéolyse de cette caséine par la présure (ou chymosine: enzyme naturelle de la caillette du jeune bovin pré ruminant) qui scinde la molécule en deux parties la partie N-terminale ou para-caséine K (1-105) et le fragment C-terminal ou caséinomacropeptide (CMP106-169) aux propriétés très contrastées:

a ph=7:

-Le CMP possède une charge électrique négative est hydrophile ;

-La paracaséine K possède une charge électrique positive est hydrophobe.

Dans le caillé, seule sont récupérées les caséines α_1 , α_2 , β et paracaséine k tandis que le CMP se trouve dans le lactosérum.

Il est à noter que le CMP contient tous les glucides, quand ils existent, sur les Thr131, 133, 135 et 136* (variant A**uniquement).On remarque la composition très particulière du peptide CMP (106 169 phosphorylé en Ser 149) qui peut être glycosylé et qui ne contient pas d'acide aminé aromatique (Eigel *et al.*, 1984).

I-2 Succédanés de présure

Divers facteurs, dont la constance et la facilité de disponibilité, les prix bas, la qualité stable et les demandes de segments de consommateurs spécifiques (par exemple, les lacto végétariens), ont déclenché la recherche d'alternatives à la présure animale à partir des années 1960 (Doris *et al.*, 2017).

Les présures provenant de quatre sources principales sont utilisées commercialement: la présure de mammifères néonataux (veau, chevreau ou agneau), la présure microbienne, la chymosine produite par fermentation et les coagulants végétaux (Therese et al., 2017).

I-2 .1 Succédanés de présure d'origine animale

Pepsine bovine

La pepsine A est la protéinase gastrique prédominante chez les mammifères adultes, et elle se caractérise par une spécificité plus faible et une dépendance au pH plus élevé que la chymosine, elle a un caractère plus acide avec un optimum au voisinage de pH 1,5-2,0 (Harboe et al., 2010).

Il existe toutefois des différences importantes dans la composition et l'activité des pepsines selon leurs origines ;pour la pepsine bovine, deux fractions ont été identifiées : la pepsine A à un comportement proche de la chymosine alors que la seconde fraction, ou pepsine b, ressemble la pepsine porcine. L'activité protéolytique de la pepsine bovine est également globalement plus faible (-25 à -71 selon le substrat) que celle de la pepsine porcine : elle est plus stable et moins dépendante du pH. La pepsine bovine contenue dans la présure peut être identifiée et distinguée de la pepsine provenant de l'animal adulte (Ramet P., 1997).

Pepsine porcine

L'extraction et l'utilisation de la pepsine porcine ont débuté durant la première guerre mondiale pour pallier une pénurie de la présure, mais n'a été réellement industrialisé qu'à partir des années 60. Elle est extraite de l'estomac de porcs sous forme inactive, puis activée par acidification à pH 2, son poids moléculaire est de 34500 Da (Ernstrom., 1983).

L'emploi de la pepsine porcine présente pour la coagulation du lait des difficultés, à cause d'une activité protéolytique supérieure à celle de la présure, avec présence d'arrière-goût et d'amertume pour certains fromages (Brulé et Lenoir., 1997).

Pepsine gastrique

La pepsine du poulet est extraite du proventricule ou ventricule succenturié qui est un renflement fusiforme de 3 cm de long en moyenne, situé au-dessus du gésier, il est revêtu d'un épithélium de cellules cylindriques.

Le pepsinogène du poulet est composé de 387 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 43000 Da. La pepsine elle, est composée de 308 résidus d'acides aminés et un poids moléculaire de 35000 Da (Bohak., 1969).

Le pH optimum de la pepsine du poulet est de 2.8. L'enzyme reste stable à pH 8, et devient inactive à pH 8,5 (Bohak., 1969).

Les travaux de (Green *et al.*, 1984), ont montré que le cheddar préparé par un mélange de pepsine de poulet et de pepsine porcine était similaire à celui préparé par de la présure. (Gordin et Rosenthal., 1978) ont utilisé la pepsine de poulet pour la fabrication de l'emmental et un autre fromage traditionnel de type Kashkaval, qui sont des fromages à pâte molle ; ils ont obtenu de meilleurs résultats et des fromages de qualité comparable à celles obtenues par la présure.

I-2.2 Succédanées de présure d'origine végétale

Les protéases végétales les plus connues sont extraites du papayer (*Carica papaya*), figuier (*Ficus glabrata*), ananas (*Ananas comosus*), sarcocarpe de melon (*Cucumis melo*). Elles sont appliquées essentiellement dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (la papaine, la ficine, la bromélaïne et cucumisine). D'autres protéases extraites de chardons (*Cynara scolymus*, *Cynara cardunculus*, *Silybum marianum*) permettent la fabrication de fromages traditionnels ; c'est le cas des cardosines et des cynarases.

Contrairement à la présure qui est spécifique à la κ -caséine, les *aspartyl-protéases* des plantes peuvent hydrolyser les caséines α , β et κ , ce qui provoque une acidité excessive, (Simões et Faro., 2004). Plusieurs préparations coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures (Ramet., 1997).

I-2.3 Succédanés de présure d'origine microbienne

Les enzymes protéolytiques microbiennes les plus largement utilisées proviennent de sources bactériennes et fongiques.

Les enzymes protéolytiques bactériennes sont généralement actives à pH neutre ou alcalin. Les espèces de *Bacillus* et de *Streptomyces* sont les plus couramment utilisés au niveau industriel. Les champignons, d'autre part, sont polyvalents dans la production d'enzymes et produisent des protéases acides, neutres et alcalines.

Les protéases alcalines des bactéries présentent une activité optimale à pH alcalin et sont tout à fait thermostables, par exemple les protéases produites par *Bacillus licheniformis* et *Staphylothermus marinus*.

Les protéases bactériennes par rapport aux protéases fongiques possèdent une thermo stabilité et une vitesse de réaction plus élevées, à l'exception de l'enzyme produite par le champignon thermophile *Malbranchea pulchella*.

Les enzymes protéolytiques de *Bacillus* et *Aspergillechave* remplacent les protéases d'origine animal dans l'industrie du cuir. En raison de la forte demande de présure dans l'industrie laitière, d'autres sources de chymosine ont été explorées. Les protéases de *Mucor michei*, *Bacillus subtilis* et *Endothia parasitica* sont maintenant utilisées pour la production de fromage par l'industrie laitière (Dhillon et al., 2017).

I-4 Coagulation du lait

La coagulation du lait est une étape importante dans la préparation du fromage. Il s'agit de la transformation du lait liquide en un gel, appelé aussi coagulum ou caillé. On distingue deux types de coagulation : la coagulation acide et la coagulation enzymatique. Cependant, en fromagerie, la coagulation du lait résulte le plus souvent de l'action combinée d'une enzyme et de l'acidification, seule varie l'importance relative de leur action coagulante respective.

I-5.1-Type de coagulation

Coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ($\text{pI}=4,6$) par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique ou par acidification chimique (injection de CO_2 , addition de glucono- δ -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 (Romain Jeantet et al., 2008).

Ce type de gel, de par la solubilisation du phosphate de calcium colloïdal au cours de l'acidification, présente une bonne perméabilité mais une friabilité élevée ; le manque de structuration du réseau (liaisons de faibles énergies de type hydrophobe) a pour conséquences une élasticité et une plasticité pratiquement nulles et une faible résistance aux traitements mécaniques (Romain Jeantet et al., 2008).

Coagulation enzymatique

La coagulation enzymatique est une étape essentielle dans la plupart des fromages où la composante caséine du système protéique du lait forme un réseau de gel qui emprisonne les graisses (Mazorra *et al.*, 2018).

La présure est le mode de coagulation dans la grande majorité des fromages du monde. Elle est induite par l'enzyme chymosine, une enzyme protéolytique hautement spécifique. La coagulation du lait par la présure à pH normal 6,6 (Ramesh C *et Chandan.*, 2014).

L'action de la chymosine (présure) par hydrolyse de la caséine kappa pour produire la para- κ -caséine et le glycomacropéptide est l'étape préliminaire de la production de fromage, entraînant la formation de caillé et de lactosérum (Kennedy., 2011).

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 (Romain Jeantet *et al.*, 2008).

I-5.2 Mécanisme de coagulation

La coagulation du lait par la présure peut se décomposer en trois étapes (**Figure 2**) :

-hydrolyse enzymatique de la caséine K

-agrégation des micelles de caséines déstabilisées

-développement d'un réseau par réticulation et formation de gel (Brulé *et al.*, 1997).

- ❖ La première étape concerne l'hydrolyse de la caséine Kappa, au niveau de la liaison peptidique Phe105-Met106, qui conduit à la formation de paracaséine Kappa (1-105) et des caséinomacropéptide (CMP 106-169).

La libération du CMP se traduit par une réduction du potentiel de surface des micelles et en conséquence, une diminution des répulsions du potentiel de surface des micelles et en conséquence, une diminution des répulsions électrostatiques qui, à l'état initial contribuent à la stabilité du système colloïdal. Lorsque, dans les conditions physiologique normale du lait, environ 80% de la caséine Kappa est hydrolysée (Brulé *et al.*, 1997).

- ❖ Au stade secondaire, les micelles s'agrègent pour former des grappes qui conduisent à la formation de gel. L'eau ainsi que les constituants solubles et les graisses sont piégés dans le réseau tridimensionnel.
- ❖ Dans la phase finale, le réseau continue à atteindre sa fermeté. La coupe du gel est chronométrée en fonction du type de fromage. Dans les fromages à pâte molle, le gel peut acquérir plus de fermeté, tandis que pour les fromages à pâte dure, le processus de coupe commence dès qu'une fermeté adéquate est atteinte (Ramesh.C et al., 2014).

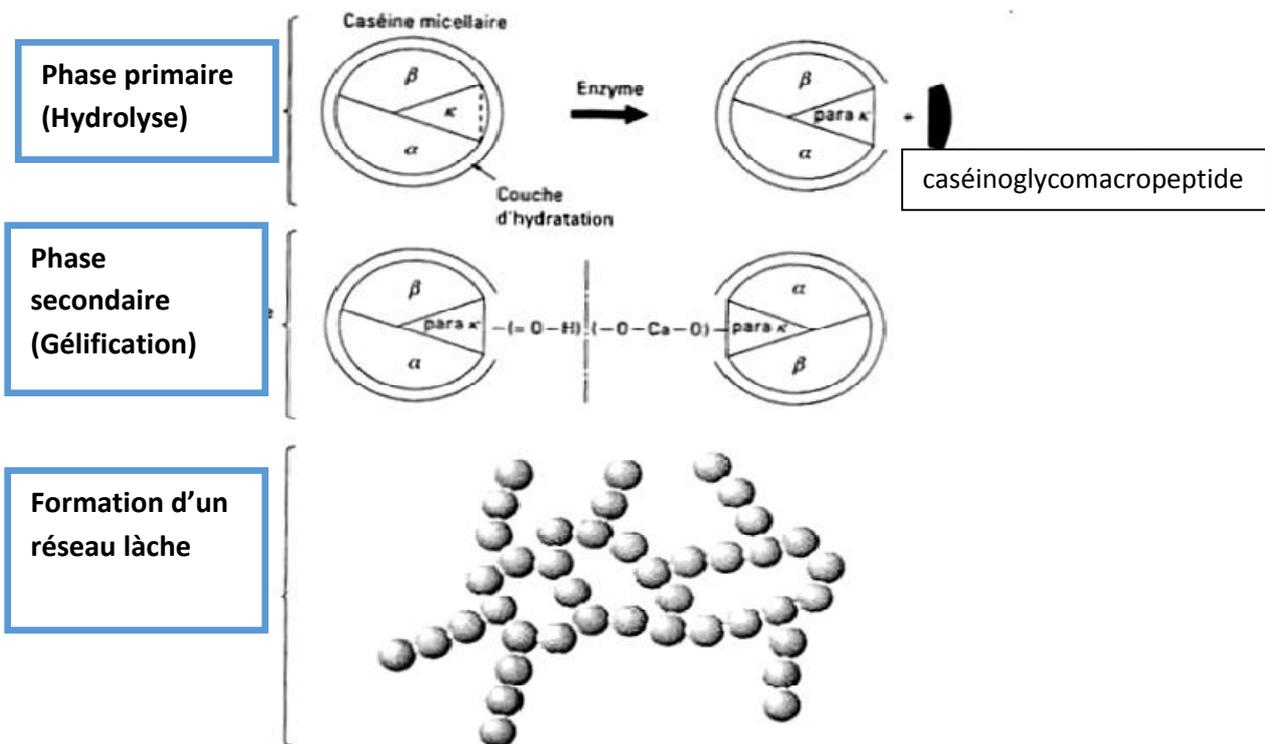


Figure N°2 : Phases du processus de coagulation enzymatique du lait .

II- Enzymes coagulants le lait

Des enzymes de coagulation du lait, obtenues à partir de sources animales, végétales et microbiennes, sont utilisées depuis l'antiquité pour la fabrication de fromages et d'autres aliments. L'enzyme gastrique de veau chymosine (présure) sous forme d'extrait brut, de pâte ou de poudre était utilisée presque exclusivement dans la fabrication du fromage commerciale. La chymosine est l'enzyme de choix et la norme par rapport auxquels tous les autres sont évaluées (Brown *et al.*, 1988).

II-1 Présure

Le terme présure est généralement dédié à une préparation enzymatique capable d'induire la formation de caillé. La présure naturelle qui provient de ruminant est un mélange de différentes espèces moléculaires et variantes génétique de la chymosine, une protéase aspartique (EC 3.4.23.4) (Doris *et al.*, 2017).

La présure de veau est l'agent coagulant traditionnellement utilisé pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de la majorité des fromages ; de petites quantités sont produites à partir de l'estomac de chevreau et d'agneau. Selon la fédération internationale du lait (FIL) la dénomination «présure» est donnée à l'extrait coagulant provenant de caillettes de jeunes ruminants abattus avant sevrage Andren.(2002). Elle contient en réalité deux fractions actives, l'une, majeure, constituée par la chymosine, l'autre, mineure, par la pepsine. Au pH du lait (6,2-6,6), la chymosine représente plus de 80 % de l'activité coagulante Andren.(2002).

La sécrétion de chymosine s'arrête au moment du sevrage lorsque des aliments solides sont présents dans la ration alimentaire, la production de pepsine s'accroît alors très fortement et devient dominante (Adoui.,2007).

Historiquement, le premier fromage a été accidentellement produit vers 5000 avant JC lors du transport du lait dans des sacs à base d'estomacs d'animaux. Depuis ce temps, la présure naturelle de la caillette de veau (principale source de chymosine) est l'agent de coagulation du lait préféré en raison de sa grande efficacité pour coaguler le lait, ce qui donne une texture de caillé appropriée et un rendement du fromage produit (Mazorra *et al.*,2018).

II-2 Chymosine

La Chymosine, une protéinase acide, est bien caractérisée au niveau moléculaire (Foltmann.,1993 ; Chitpinityol et Crabbe.,1998 ; Crabbe.,2004). L'enzyme, qui a été séchée dans les années 40 (Hankinson.,1943 ; Berridge.,1945), est un polypeptide à chaîne

unique contenant environ 323 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire de 35 600 Da. Sa structure primaire a été établie et une quantité considérable d'informations est disponible sur ses structures secondaires et tertiaires (**Figure 3**).

La molécule existe sous la forme de deux domaines séparés par la fente du site actif dans laquelle se trouvent les deux résidus aspartyles catalytiquement actifs (Asp32 et Asp215) (Plowman *et al.*, 1995).

La chymosine est présente dans l'épithélium sécrétoire sous forme de pro-chymosine, le précurseur inactif de l'enzyme. Le pH acide dans l'estomac entraîne la conversion de la pro-chymosine à la chymosine active (Cheeseman G.C, 1981), (acidification à pH 2-4, entraîne l'élimination d'un peptide à 44 résidus de l'extrémité N-terminal du zymogène) (Therese *et al.*, 2017).

L'enzyme peut être obtenue à partir de la présure par précipitation de sel, et obtenue comme cristaux purs par recristallisation répétée. L'enzyme est classée comme protéinase aspartate parce que, en commun avec d'autres enzymes de ce type, elle a deux résidus d'acide aspartique impliqués dans le site actif (Cheeseman., 1981).

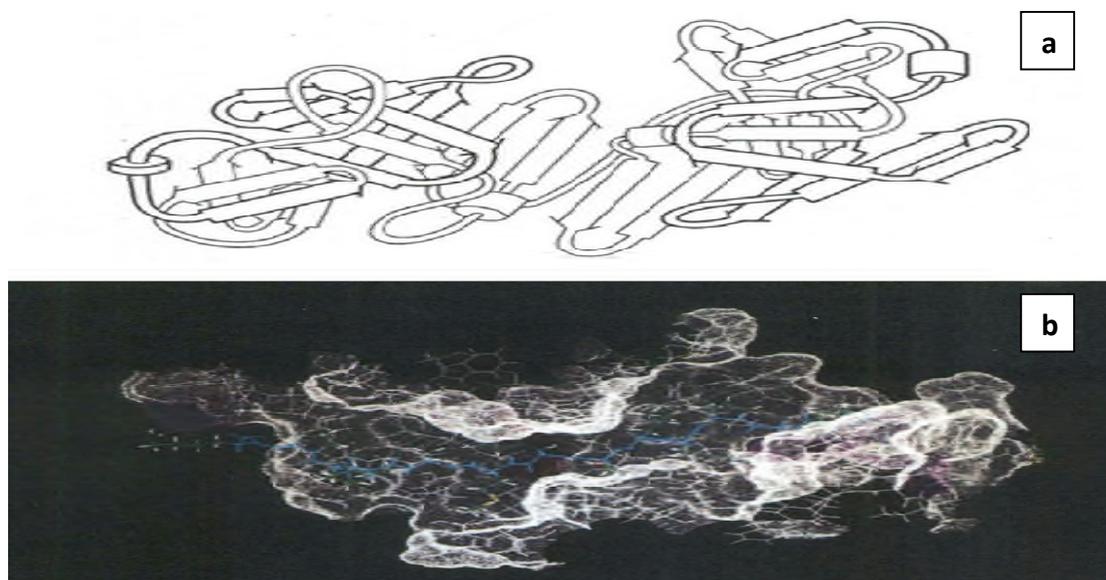


Figure N°3 : Représentation schématique des structures secondaires et tertiaires de la chymosine, montrant la fente du site actif dans laquelle s'insère la séquence comprenant les résidus d'acides aminés 102-108 de la caséine κ ((a) de Foltmann.(1987); (b) de Plowman et Creamer.(1995)

II-3 Pepsine

La pepsine est la principale protéase acide de l'estomac. Elle est généralement reconnue comme la première enzyme à être découverte (au XVIII^e siècle) et a été nommée par T. Schwann en 1825 (Tang J., 2013).

L'enzyme protéolytique pepsine se trouve dans le suc gastrique de tous les vertébrés. Les cellules centrales ou principales de la muqueuse gastrique sécrètent le pepsinogène précurseur inactif, (Rick W, 1965) il contient un propeptide supplémentaire de 44 résidus à l'extrémité N-terminale. Contrairement à la pepsine, le pepsinogène est stable dans les solutions neutres et alcalines. En rencontrant le milieu acide de l'estomac, le pepsinogène est converti en pepsine avec l'élimination du pro peptide. Le proptptide du zymogène porcin, contrairement à la pepsine elle-même, contient 10 groupes de base en excès (Tang J., 2013) .

L'activation (pH <5,0) est un processus auto catalytique. L'enzyme divise les liaisons peptidiques, mais pas les esters d'acides aminés ou les amides. Les liaisons dans lesquelles le groupe amine de la phénylalanine ou de la tyrosine et le groupe carboxyle de l'acide glutamique sont particulièrement facilement hydrolysées. Pour l'insuline, les liaisons entre la leucine et la valine sont également hydrolysées (Rick W., 1956).

La pepsine est une endopeptidase avec une large spécificité. Un dosage de la pepsine est le plus souvent effectué à un pH proche de 2 en utilisant l'hémoglobine bovine comme substrat (Figure 4) (Tang J., 2013).

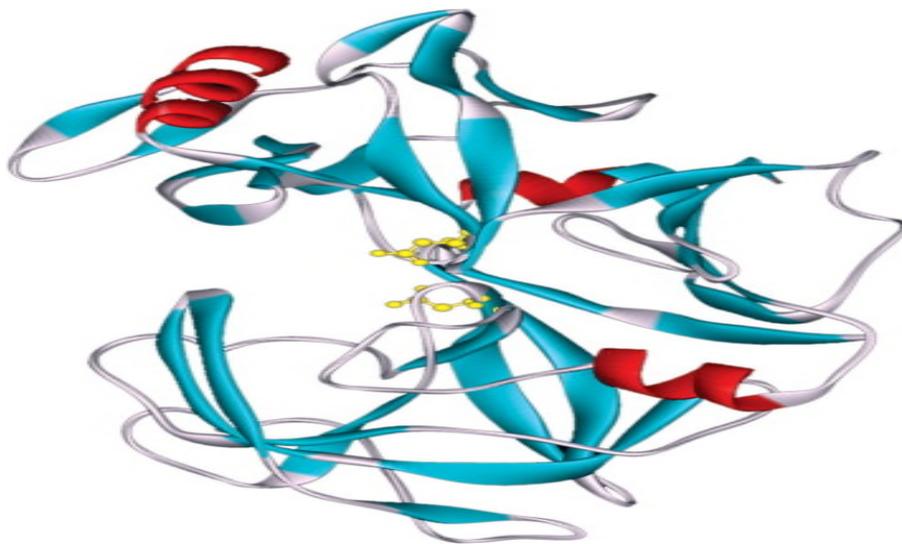


Figure N°4 : Structure schématique de la pepsine (Jean-pierre., 2004).

III Présentation de la citrouille (*Cucurbita pepo*)

La citrouille (*Cucurbita pepo*) est une plante rampante, compacte ou semi-arbustive, annuelle, monoïque; pubescente et rugueuse. Les feuilles sont largement ovales-cordées à triangulaires-cordées, de 20 à 30 x 20 à 35 cm, avec ou sans taches blanches; elles comportent souvent de trois à cinq lobules profonds et avec des marges denticulées à dentelées-denticulées. Les vrilles ont de deux à six rameaux ou sont des vrilles simples et peu développées dans les types semi-arbustifs.

Les fleurs sont pentamères, solitaires, axillaires; les fleurs mâles sont dotées de pédicelles de 7 à 20 cm de long, d'un calice campanulé de 9 à 12 mm et de sépales linéaires de 12 à 25 x 1 à 2 mm; la corolle est tubulaire campanulée, de 5 à 10 cm de long, divisée en cinq jusqu'au tiers ou plus de sa longueur; il y a trois étamines.

Les fleurs femelles sont dotées de pédicelles robustes, sulcifères, de 2 à 5 cm; l'ovaire est sphérique, aplati, ovoïde, cylindrique, rarement piriforme, lisse, côtelé ou verruqueux et multiloculaire; le calice est très réduit. Les fruits sont de taille variable et de formes diverses, légèrement à fortement côtelés, souvent verruqueux, rarement lisses, avec une peau rigide, de colorations diverses, de vert clair au vert foncé, uni ou à petites taches crème ouvertes contrastant avec le jaune, l'orange ou le bicolore; la chair est crème ou jaunâtre ou orange pâle, de douce et non amère à fibreuse et amère; elle a des graines nombreuses, étroitement ou largement elliptiques à rarement orbiculaires, légèrement comprimées, de 3 à 20x4 à 12 mm (Lira Saade et Montes Hernández., 1994).

III-1 Origine de la plante

Selon les observations archéologiques, *Cucurbita pepo* paraît comme l'une des premières espèces domestiquées. Les vestiges les plus anciens ont été trouvés au Mexique, dans la vallée d'Oaxaca (de 8750 av. J.-C. à 700 ap. j.-C.) et dans les grottes d'Ocampo, Tamaulipas (de 7000 à 5000 av. J.-C.). Sa présence aux États-Unis est également très ancienne, comme l'indiquent l'enregistrement au Missouri (4000 av. J.-C.) et au Mississippi (1400 av. J.-C.). Cette espèce a pu être domestiquée au moins en deux occasions et dans deux régions différentes: au Mexique et dans l'est des États-Unis, les progénitures possibles étant respectivement *C. watsoniana* et *C. texana* (Figure 5) (Lira Saade et Montes Hernández., 1994).



Figure N°5 : Variations de fruits de citrouille (*Cucurbita pepo*) (Solomon., 2019)

III-2 Systématique

La plante de *Cucurbita Pepo* est scientifiquement classée selon (Vanier., 2007) comme suit:

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Subdivision : Spermatophytes

Classe : Magnoliopsida

Superordre : Rosanae

Ordre : Cucurbitales

Famille : Cucurbitaceae

Genre : *Cucurbita*

Espèce : *Cucurbita pepo*

III-3 Utilisations et valeur nutritive

Comme les autres espèces cultivées du genre, les fruits murs ou verts et les graines de *Cucurbita pepo*, et dans une moindre mesure les fleurs et les pointes tendres des tiges, se consomment dans de nombreuses zones de sa région de distribution native et dans d'autres régions du monde. L'apport d'éléments nutritifs de *C. pepo* est analogue à celui décrit pour les autres espèces cultivées (Lira Saade et Montes Hernández.,1994).

IV Fromage

La définition «fromage» est réservée au produit fermenté ou non ,affiné ou non,obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitières (lait,lait partiellement ou totalement écrimé,crème,babeurre) utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la phase aqueuse (Romain Jeantet et al., 2008).

Le fromage peut être assimilé à une concentration des éléments majeurs du lait (protéines,matière grasse),réalisée par égouttage d'un coagulum obtenu par acidification et ou action d'un enzyme (Romain Jeantet et al., 2008).

IV-1-Technologie de la fabrication du fromage

La fabrication du fromage comporte trois phases principales :

- ❖ La coagulation.
- ❖ L'égouttage.
- ❖ L'affinage.

Coagulation

L'étape caractéristique essentielle de la fabrication de toutes les variétés de fromages est la coagulation de la composante caséine du système protéique du lait pour former un gel qui emprisonne la graisse, le cas échéant. La coagulation peut être réalisée par: 1 protéolyse limitée par des protéinases sélectionnées; 1 acidification à pH 4,6; 1 acidification à pH environ 5,2 en combinaison avec la chaleur à 90 C (Patrick.F et al., 2017).

Egouttage

L'égouttage c'est l'étape de séparation du caillé et du lactosérum, la nature du fromage fabriqué dépend de la méthode d'égouttage appliqué.

L'égouttage est le résultat de deux phénomènes physiques différents :

- Un phénomène actif, la synérèse.
- Un phénomène passif, L'exsudation spontanée du sérum, liée à la perméabilité du coagulum, est une des caractéristiques des gels lactiques (Alais.,1984).

Salage

Peut être fait dans la masse (salage des grains de caillé), en surface (salage sec) ou dans un bain de saumure (ECK., 1987).

Affinage

L'affinage correspond à une phase de digestion enzymatique sous l'action d'enzymes, pour la plupart élaborées par la flore microbienne présente. Les constituants du caillé sont dégradés. La pâte est ainsi modifiée dans son aspect, sa texture et sa consistance, ce qui lui permet de passer sous la forme d'un produit élaboré dénommé fromage (Khoualdi., 2017) .

L'affinage est en fait la résultante de trois principales actions biochimiques qui se déroulent simultanément à savoir :

-la dégradation des protéines.

-l'hydrolyse de la matière grasse.-la fermentation du lactose (Romain et al., 2008) .

I-Matériel végétal

Le travail est effectué sur les graines du *Cucurbita pepo* séchées dans une étuve à 40°C pendant 30 minutes (**Figure6**), et broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre. Cette dernière est solubilisée dans l'hexane puis laissée à l'abri pendant 24heures et le résidu ainsi obtenu est mélangé avec de l'eau distillé puis centrifugée à 5000g pendant 20minutes. Le surnageant ou l'extrait brut est alors récupéré et reparti dans des Ependorfs (2ml) qui seront conservés au congélateur (- 18).



Figure N°6 : photographie des graines de la citrouille *Cucurbita pepo*

II-Caractérisation physico-chimique de l'extrait brut

Pour la caractérisation de l'extrait enzymatique brut des graines de *Cucurbita pepo*, diverses analyses ont été menées à savoir ; le taux en matière sèche, le pH et la teneur en protéine.

II-1 le taux de matières sèches

L'humidité et le taux de matières sèches de l'extrait enzymatique étudié ont été déterminés selon la méthode décrite dans la norme (AFNOR., 1981).

Un échantillon de 1 ml de l'extrait enzymatique est placé dans une capsule en verre préalablement taré. Il est ensuite mis à l'étuve à 103°C ± 2°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante puis, il est refroidi dans un dessiccateur. Le pourcentage en matière sèche est déterminé par la relation suivante:

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

Pi : poids initial en gramme, de la prise d'essai ;

P : poids en gramme, de la prise d'essai séchée après passage dans l'étuve à $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A partir le taux de matières sèches, le taux d'humidité (H %) a été déterminé selon la formule suivante :

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

II-2 Mesure de PH

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 brut, dont la mesure est réalisée en cinq répétitions.

II-3 Teneur en protéines

La concentration de la protéine présente dans l'extrait enzymatique brut de graines *Cucurbita pepo* a été déterminée en utilisant la méthode de Bradford,(1976) , rapporté par [Abhiraman Kumar et al.\(2020\)](#) dont le sérum albumine bovine (SAB) est utilisé comme protéine standard.

La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique dont le principe repose sur l'adsorption du bleu de Coomassie G-250 sur les protéines (avec les acides aminés basiques tel que : Arg, Lys, His).

Pour 125 μl de l'extrait enzymatique de *Cucurbita pepo* dilué avec 375 μl de l'eau distillée, 2mL de réactif de Bradford sont ajoutés. Une fois bien homogénéisé avec un vortex, l'ensemble est gardé à l'obscurité et à température ambiante pendant 20 minutes, et l'absorbance est alors mesurée au spectrophotomètre à 595nm.

La concentration en protéines, des extraits enzymatiques, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage avec la protéine du sérum albumine bovine (SAB) réalisées dans es même conditions expérimentale que les échantillons.

III-Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de l'extrait brut de *Cucurbita pepo* est estimée par deux méthodes, à savoir la mesure de l'activité protéolytique et l'évaluation de l'activité coagulante.

III-1 Détermination de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode décrite par [Green et Stackpoole. \(1975\)](#), basée sur la mesure de la quantité des peptides et des acides aminées formées par hydrolyse de substrat par une protéase.

En effet, l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique 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 µg de tyrosine libérée en heure de digestion par 1ml d'extrait enzymatique avec comme substrat, soit la caséine, soit l'hémoglobine [\(Mechakra et al., 1999\)](#).

Le mélange réactionnel consiste à mélanger 1g de caséine dans 50 ml de tampon phosphate (0,1M, pH 7).

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

L'ensemble est alors centrifugé, et 0,5 ml de surnageant est additionné de 2,5 ml de la solution C préparée en mélangeant un volume de 100 ml de la solution A avec un volume de 2 ml de la solution B.

La solution A est préparée en mélangeant 1g d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 5 g de carbonate de sodium (Na_2CO_3) dans 250 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 0,032g de sulfate de cuivre CuSO_4 dans 10 ml d'eau distillée.

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

Une fois bien agité et incubé à température de 35°C pendant 20 min, une coloration bleue apparaît, et l'absorbance est alors mesurée à 660 nm.

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

L'activité protéolytique, exprimée en $\mu\text{g/h.ml}$, correspond à la libération de $1\mu\text{g}$ de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans 1ml de substrat.

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

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

$$\text{Activité spécifique} = \text{activité enzymatique (U)} / \text{teneur en protéines (mg)}$$

III-2 Evaluation de l'extrait coagulant

L'activité coagulante qui exprime par la rapidité avec laquelle l'enzyme coagule le lait, est déterminée selon la méthode de Berridge,(1955)rapportée par (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 exprimée en unité d'activité coagulante (U.A.C) ou d'unité 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 (Benyahia *et al.*, 2010)

Le substrat de Berridge est préparé par l'addition de 12 mg de lait écrémé à 100ml de solution de CaCl_2 (0,01M). Après 30 minutes 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, dont un volume de 5ml de ce substrat (35°C) sont additionné de 500 μL l'extrait enzymatique.

La mesure du temps de coagulation correspond au temps s'écoulant entre l'addition de l'extrait enzymatique au de substrat de Berridge, et de l'apparition des premiers flocons caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne de tube incliné, subissant un lent mouvement rotationnel. L'activité coagulante, exprimée en Unité Présure (UP), est calculée selon l'expression suivante :

$$\text{U.A.C (UP)} = \frac{100 \cdot V}{10 \cdot t \cdot v}$$

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

v = volume de l'extrait d'enzyme;

t = temps de floculation en secondes.

L'activité coagulante peut être également exprimée par la force coagulante (F), donnée en unité Soxhlet (US), représente le nombre de volumes de lait frais coagulé par un volume d'extrait coagulant, pendant un temps de 40min à 35°C (Tsouli ., 1979 ; Alais., 1984)

La force coagulante est exprimée par la formule suivante:

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

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.

IV- Détermination des conditions optimales de l'activité coagulante

IV-1 Effet de la température sur l'activité coagulante

L'influence de la température sur l'activité coagulante a été étudiée en mesurant l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de la *Cucurbita pepo*, à différentes températures (35 ; 40 ; 45 ; 50 ; 55 ; 60 ; 65, 70), 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_2 de 0,01M, et un $\text{pH}=6,4$.

IV-2 Effet du pH sur l'activité coagulante

L'influence du potentiel hydrogène (pH) du lait sur l'activité coagulante a été étudiée en mesurant l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de *Cucurbita pepo* à température optimale, mais à différents pH, en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique. Le substrat de Berridge préparé dans les mêmes conditions, à savoir la concentration en CaCl_2 (0,01M).

Le pH du lait a été ajusté pour les valeurs de 6,0 ; 6,5 ; 7,0 ; 7,5, par l'addition des solutions de HCl (0,1N) ou de NaOH (0,1N).

Le choix de cet intervalle de pH est basé sur le fait qu'à des valeurs de pH inférieur à 5 la coagulation peut devenir une coagulation acide. L'augmentation du pH à des valeurs supérieures à 7 peut provoquer l'inactivation de la protéase employée (Huppertz et al., 2006).

IV-3 Effet des ions de calcium sur l'activité coagulante

L'influence de la concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut de la *Cucurbita pepo* a été étudiée à 35°C et à $\text{pH}=6,5$, en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique, préparé avec différentes concentrations en CaCl_2 : 0.005 ; 0.01 ; 0.02 ; 0.03 ; 0.04 ; 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 substrat de Berridge, à la concentration en CaCl_2 donnée, et de l'apparition des premiers flocons caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne de tube incliné, subissant un lent mouvement rotationnel.

IV-4 Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique

L'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique de *Cucurbita pepo*, est déterminée selon le protocole de [Green and Stackpole \(1975\)](#), en variant la concentration du volume enzymatique de 10 à 60 mg/ml.

I- Caractérisation physico chimique de l'enzyme

Les résultats de l'étude des caractéristiques physico-chimiques et activité enzymatique de l'extrait enzymatique brut des grains de la citrouille *Cucurbita pepo*, sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau IV : Caractéristiques physico-chimiques et activité enzymatique de l'extrait enzymatique brut de la *Cucurbita pepo* étudié.

Paramètres	Extrait brut des graines
Teneur en protéines (mg/ml)	51,70±1,51
Activité protéolytique (µg/ml.h)	108,74±0,33
Activité protéolytique spécifique (µg/mg.h)	2,10
Activité coagulante (UP)	15,42±0,17
Force coagulante (F)	3703
Couleur	Brune claire
pH	5,13±0,01
Rendement (%)	74
Matière Sèche (%)	20±0,01

L'extrait enzymatique brut des graines de la citrouille *Cucurbita pepo* obtenu est une solution limpide de couleur brune claire de pH acide (5,13) à taux de matière sèche d'environ de 20% avec un taux de protéines de 51,70mg/ml. Ces caractéristiques sont confirmées par les résultats de (Dash et al., 2016).

I-1 Teneur en protéine

Les résultats de la présente étude montrent que la teneur en protéine de l'extrait enzymatique étudié est de 51,70 mg/ml. Ce résultat obtenu est différent de ceux rapportés par la bibliographie.

En effet, Dash et al. (2016) ont retrouvés des taux de protéines de l'extrait brut des graines de la citrouille de l'ordre 105,3mg/ml, tandis que Ziaul Amina et al. (2019) ont rapportés une valeur de 21.313 mg/ml.

I-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 protéase.

Les résultats (**tableau IV**) de l'estimation de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique étudié indiquent que l'activité protéolytique de l'extrait de *Cucurbita Pepo* est estimé à $108,74 \pm 0,33 \mu\text{g/ml.h}$.

Cette activité protéolytique excessive de l'extrait brut des graines de la citrouille a été signalés par plusieurs auteurs (Sharma et al., 2012) ; Shah, Mir et al., 2014).

Selon l'étude de Dash et al., (2016) L'activité protéolytique des extraits des graines de la citrouille est estimée à $286 \mu\text{g/ml.h}$.

Fox P et al. (2003) et Walstra. (1999) ont signalés que l'extrait enzymatique de la citrouille manifeste une activité protéolytique excessive due a son action non spécifique envers les autres caséines (α et β).

Cette activité protéolytique non spécifique des protéases végétales envers les fractions des caséines & et B est responsable de l'amertume du faible rendement fromager, ce qui limite leur utilisation dans la fabrication des fromages (Akar and Fadilglu., 1999).

Les résultats du (**tableau IV**) montrent que l'activité protéolytique spécifique de l'extrait brut estimée a $2,10 \mu\text{g/ml.h}$ de protéines (protéines enzymatiques et également des protéines non enzymatiques).

I-3 Activité coagulante

Les résultats de la présente étude (**tableau IV**) montrent que l'activité coagulante de l'extrait enzymatique étudié est a $15,42 \pm 0,17$ (UP).

Selon les travaux de Nouani, Dako et al. (2009) l'activité coagulante de l'extrait brut des graines de la citrouille est de l'ordre de 1500 UP. Mohamed Ahmed et al. (2010) ont rapporté des valeurs de 880UP.

Cette différence, avec les résultats de la présente étude, peut être attribué a plusieurs facteurs, comme le caractère variétal, le sol et les conduites agronomiques et le climats, ainsi que le taux d'ensoleillement (Durand., 1982).

II-Détermination des conditions optimales de coagulation de l'extrait enzymatique étudié

II-1 Effet de la température sur l'activité de l'extrait brut des graines de la citrouille

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

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

Les résultats obtenus, de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits des graines de la citrouille sont représentés dans la figure n°7.

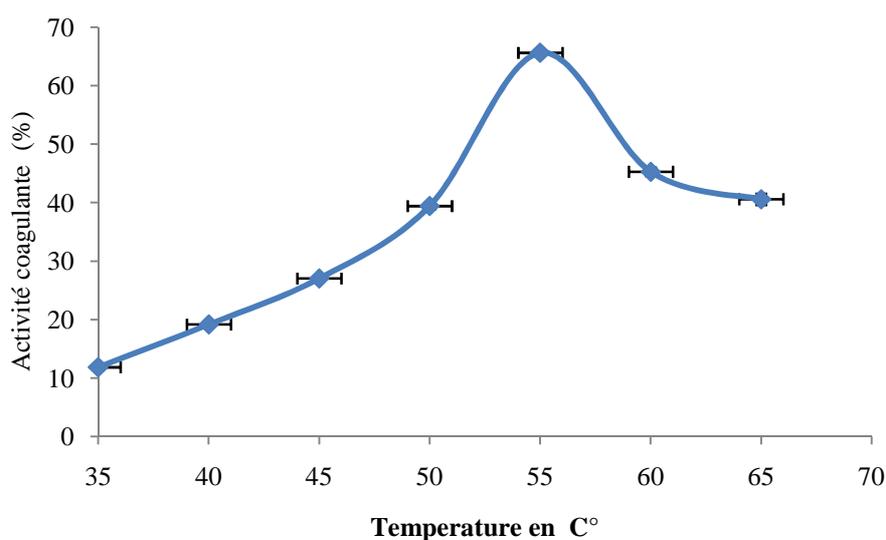


Figure n°7 : Effet de la température sur l'activité de coagulante de l'extrait enzymatique étudié

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

D'après les résultats obtenus également, l'activité coagulante de l'extrait brut des graines de citrouille atteint la valeur maximale à la température de 55°C, et diminue au-delà de cette température. Ce résultat est très similaire à celui rapporté par plusieurs auteurs (Madhu *et al.*, 2019 ; Emilia *et al.*, 1989), qui ont rapporté une activité enzymatique maximale des graines de citrouille à l'intervalle de température comprises entre 40°C et 55°C.

Selon Abhiraman Kumar *et al.* (2020), la température optimale de l'extrait enzymatique des graines de citrouille est au alentours de 54°C, alors que Yang *et al.* (2017), ont rapportés que la température optimale au voisinage de 35°C.

L'augmentation de la température du lait entraîne une acidification très nette de l'activité coagulante de l'extrait étudié, toutefois, cette amélioration est plus importante dans le cas de l'extrait enzymatique brut (Dybowska., 1996 ;Horne et Banks., 2004).

L'effet de la température résulte de la conjugaison de deux effets, l'un sur la réaction enzymatique, l'autre sur la phase secondaire de la coagulation et qui correspond à l'étape d'agrégation. En effet, la coagulation du lait ne peut avoir lieu qu'à des températures supérieures ou égales à 18°C. cela est due aux interactions hydrophobes dans l'agrégation des micelles hydrolysées (Home et Banks., 2004).

Le processus de l'inactivation de l'enzyme à des taux extrêmement élevés de température s'étale sur deux étapes, d'abord par l'ouverture partielle des structures ; secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme qui sont due à la rupture des liaisons covalente et des liaisons hydrophobes. Plus loin la structure primaire de l'enzyme change car certains acides aminés sont endommagés par le chauffage (Masfufatun., 2009).

II-2 Effet du pH sur l'activité de l'extrait brut des graines de la citrouille

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 du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut des graines de la citrouille a été étudié en ajustant le pH du lait (substrat de berridge) aux valeurs de l'intervalle 6,0 à 8,0 pour l'extrait brut des graines de la citrouille.

La température d'incubation est fixée à 60°C pour l'extrait brut des graines de la citrouille.

Les résultats obtenus, de l'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait brut des graines de la citrouille sont représentés dans la figure n°8.

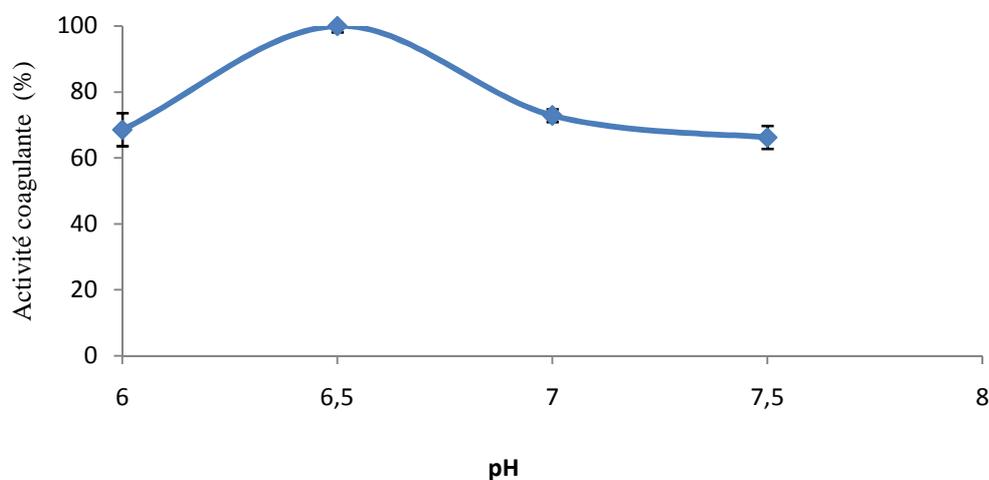


Figure n°8 : Effet de pH sur l'activité de coagulante des extraits enzymatiques étudiés

Les résultats obtenus montrent, également, que l'activité coagulante de l'extrait brut des graines de la citrouille, augmente progressivement avec l'augmentation du pH. Elle est de l'ordre de 60,9% à la valeur du pH 6 et atteint le 100% au voisinage du pH 6,5.

L'extrait brut des graines de la citrouille est plus actif dans le domaine acide, que dans le domaine neutre, ce qui est en accord avec les travaux de [Abhiraman Kumar et al. \(2020\)](#), qui ont rapporté que l'enzyme est instable à pH neutre et plus stable à pH acide.

Des résultats similaires ont été déjà rapportés par [Murlidhar et al. \(2017\)](#), montrent que les différentes formes des graines de la citrouille sont plus actives au gamme de pH acide.

II-3 Effet de la concentration en chlorure de calcium sur l'activité de l'extrait brut des graines de la citrouille

L'addition du chlorure de calcium au lait, se traduit par l'augmentation du taux d'agrégation des protéines (Flueler et Puhan., 1978 ; Gastaldi *et al.*, 1994).

L'effet de la concentration du CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut de graines de la citrouille et de la présure a été étudié en variant la concentration en CaCl_2 du lait (substrat de berridge) aux valeurs de 0,005 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 et 0,05 M pour l'extrait brut des graines de la citrouille.

Les résultats obtenus par l'effet de la concentration de CaCl_2 , sur l'activité coagulante de l'extrait des graines de la citrouille sont représentés dans la figure n°9.

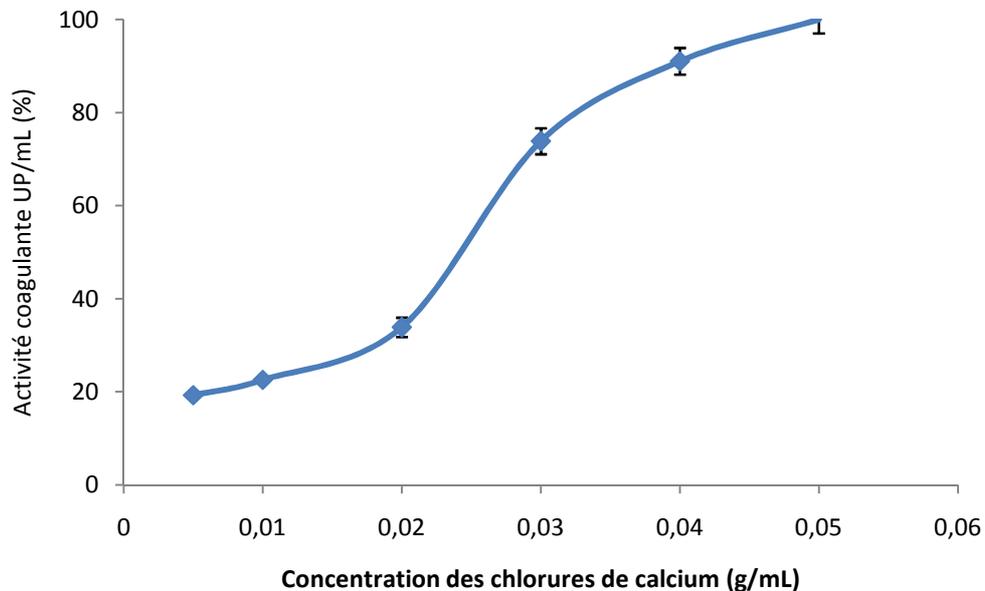


Figure n°9: Effet de la concentration en CaCl_2 sur l'activité de coagulante de l'extrait enzymatique étudié

Les résultats obtenus dans la présente étude, montrent que l'activité coagulante de l'extrait étudié augmente avec l'augmentation de la concentration du CaCl_2 , dont l'activité, la plus élevée est observée à la concentration de 0,05M pour l'extrait enzymatique de *Cucurbita pepo*.

En accord avec Balcones *et al.* (1996) ; Montilla *et al.* (1995) ; Storry *et al.* (1983) ; Tervalá *et al.* (1986).

Pour les concentrations élevées, l'activité coagulante baisse par un effet inhibiteur de l'ion calcium. Ceci s'explique par l'inhibition des caséines du lait (Cheftel *et al.*, 1977).

Selon Daviau *et al.* (2000), le calcium a des effets opposés en fonction de la concentration de pH. Lorsque le lait contient environ de 18 mM de CaCl_2 , une augmentation de taux de formation du gel et de sa fermeté à pH élevé (au voisinage de 6,8) est observée mais l'opposé se produit à pH en dessous de 4,5 faible ce résultat confirme que l'effet du calcium sur le taux de raffermissement du gel est fortement dépendant de pH. Ceci est en accord avec les résultats trouvés par d'autres Daviau *et al.* (2000) ; Najera *et al.* (2003), indiquant que les interactions électrostatiques ainsi les répulsions stériques jouent un rôle complémentaire dans la déstabilisation micellaire.

II-4 Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique de l'extrait brut des graines de la citrouille

L'effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité enzymatique protéolytique de l'extrait enzymatique étudié est déterminé par la mesure de l'activité enzymatique 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 enzymatique de l'extrait brut des graines de *Cucurbita*, sont représentés dans la figure n° 10.

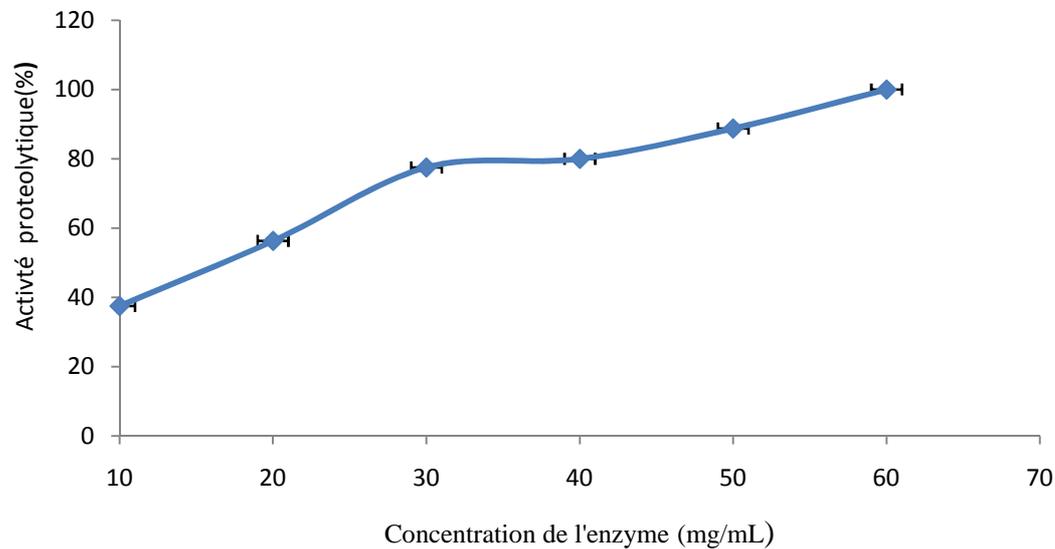


Figure n°10: Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique des extraits enzymatiques étudiés

Les résultats obtenus, montrent que la concentration de l'enzyme influence l'activité protéolytique de l'extrait étudié, et l'augmentation de la concentration de l'enzyme dans le milieu réactionnel entraîne une augmentation de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique de *Cucurbita pepo*.

L'activité protéolytique la plus faible est enregistrée à la concentration de l'enzyme de l'ordre de 10mg/ml, qui est estimée à 40% pour l'extrait brut des graines de *cucurbita*. Cette activité augmente, avec une allure plus importante, pour l'extrait brut des graines de *Cucurbita*, pour les mêmes concentrations d'enzyme dans le milieu. L'activité protéolytique

augmente au fur et à mesure que la concentration de l'enzyme augmente, dont l'activité la plus élevée (305,25 $\mu\text{g/ml/min}$) est enregistrée à 60 mg/ml de l'enzyme.

Plus la concentration de l'enzyme augmente dans le milieu plus le temps de coagulation diminue, avec une augmentation de taux de gel mais sa fermeté s'affaiblie (Najera *et al.*, 2003).

Conclusion

Cette étude a permis de contribuer aux travaux de recherche préexistants dans le domaine de l'industrie fromagère, et de renforcer l'idée de pouvoir trouver de nouvelles sources potentielles de succédanés de présure.

Ce travail visait la caractérisation d'un agent coagulant extrait à partir des graines de la citrouille *Cucurbita pepo*. et tester la possibilité de son utilisation dans la fabrication de fromages.

Pour atteindre l'objectif de l'étude, notre démarche a comporté la récupération des matières premières renfermant le système enzymatique recherché, l'extraction de l'extrait brut de l'enzyme et sa caractérisation en déterminant sa teneur en protéines, ses activités coagulante et protéolytique ont été effectuées, ainsi que l'étude de l'influence des paramètres physicochimiques du lait (température, pH et $[CaCl_2]$, [caséines]), et la concentration en extrait enzymatique sur ses activités coagulante et protéolytique.

Les résultats obtenus de la caractérisation physicochimique de l'extrait brut de *Cucurbita pepo* montrent que :

- Une activité coagulante de 15,42UP;
- Une force coagulante de 22771 ;
- Une teneur en protéine de 51,70 mg/ml;
- Activité protéolytique est de 108,74 μ g d'équivalent tyrosine/ml/min.

L'étude des conditions optimales d'activité a montré que le pH optimal de coagulation pour l'extrait enzymatique étudié est dans le domaine neutre évalué à 6,5 .

Pour la température optimale de coagulation, les résultats obtenus révèlent que l'optimum d'activité pour l'enzyme étudié est obtenu à une température avoisinant 50-55°C.

Concernant la concentration en chlorure de calcium, nous avons remarqué que l'optimum pour l'enzyme extrait de *Cucurbita pepo* est de 0,05M, et l'augmentation de la concentration de l'enzyme dans le milieu réactionnel entraîne une augmentation de l'activité protéolytique de l'enzyme.

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

Cet extrait est obtenu à partir de matières assez disponibles et inexploitées.

Conclusion

Cependant il est intéressant de compléter cette étude par :

- L'étude des différents facteurs influençant l'extraction de cet enzyme afin d'améliorer la qualité et le rendement d'extraction;
- La purification et l'optimisation de l'enzyme afin d'envisager d'autres utilisations;
- Aussi il est intéressant d'essayer d'appliquer l'extrait de l'enzyme pour la fabrication des différents types de fromages.

Références Bibliographiques

Référence partie théorique

A

Abhiraman Kumar, Soumya Sasmal.,(2020)., Rheological and physico-chemical properties of milk gel using isolate of pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds: A new source of milk clotting peptidase. *Food Hydrocolloids*.

Adoui F.,(2007). *Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir de proventricules de poulet*. mémoire, université MENTOURI, 65.

Afnor,(1981).Lait et produit literie, méthodes d'analyses, recueil des normes française Ed, AFNOR-paris.

Akar B and Fadiloglu (1999) Teleme production by purified ficin. *Journal of Food Quality* 22:671-680.

Alais C.,(1984).Sciences du lait. Principe des techniques laitières. Ed. Sepaic, Paris,4ème Ed., 68.

Alais , C. (1984) : Science du lait. Principes des techniques laitières. *Ed. SEPAIC*, 4^{ème} édition 814.

Amiot J ; Fournier F ; Lebeuf Y ; Paquin P ; Simpson R.,(2002). Composition, Propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique .du lait Dans : Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses Polytechnique, Montréal, p.1-73.

B

Balcones E,Olano A and Calvo MM (1996) Factors affecting the rennet clotting properties of ewe's milk. *Journal of agricultural and food chemistry* 44 :1993-1996.

Bayraktar, H. and S. Önal (2013). "Concentration and purification of α -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning." *Separation and Purification Technology* 118: 835-841.

Benyahia-Krid, F., H. Attia, et al. (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 ;(1945) ; The purification and crystallization of rennin. *Biochem Journal*,39, 179-186.

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.

Bohak Z. (1969) Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin, *The journal of Biological chemistry* Vol. 244, N° 17 Sept 1969 PP 4638-4648.

Brulé G.,J.lenoir et F.remeuf(1997). la micelle de caséine et la coagulation du lait,in (André Eck et Jean-claude gillis), *le fromage . 3^{ème} édition.* Lavoisier, paris, p7-38.

C

Carlson A,Hill Jr CG and Olson NF(1987) kinetics of milk coagulation:I.the kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation.*Biotechnology and bioengineering* 29:582-589.

Chandan Ramesh. C.,(2014). *CHEESE / Cheese in the Marketplace. Encyclopedia of Food Microbiology, 384–394.*

Cheeseman G.C. (1981). Rennet and Cheesemaking. In: Birch G.G., Blakebrough N., Parker K.J. (eds) *Enzymes and Food Processing.* Springer, Dordrecht, 195-211.

D

Dash Priyanka.,& Gosh, G., (2016). Proteolytic and antioxidant activity of protein fractions of seeds of *Cucurbita moschata*. *Food Bioscience*, 18, 1-8.

Daviau C,Famelart M-H,Pierre A,Goudédranche H and Maubois J-L (2000) Rennet coagulation of skim milk and curd drainage :effet of ph,casein concentration,ionic strength and heat treatment.*Le lait* 80 :397-415.

Debry, G (2001)."Lait, nutrition et santé", Edition Tec & Doc La voisier, paris.

Dhillon, K. Sharma, V. Rajulapati, A. Goyal.,(2017).Proteolytic Enzymes.In(Ashok Pandey, Sangeeta Negi and Carlos Ricardo Soccol),*Current Developments in Biotechnology and Bioengineering.*Elsevier B.V.pages149-173

Doris J., Harald R., (2017). Rennets: Applied Aspects. IN : Paul L.H. McSweeney, Patrick F. Fox, Paul D. Cotter, David W. Everett, Cheese (Fourth Edition). Academic Press, 2017, 53-67.

Durand, J.-R. and J.-M. Chantraine (1982). "L'environnement climatique des lagunes ivoiriennes." Revue d'Hydrobiologie Tropicale 15(2): 85-113.

Dybowska B, Fujio Y.,(1996) Effets of temperature and GDL concentration on milk aggregation and gelation process as revealed by optical method.Milchwissenschaft 51:557-560.

E

ECK (1987) .Le fromage, Ed : TEC et DOC , Lavoisier

Eigel WN,Butler JE,Emstrom CA et al,(1984).Nomenclature of proteins of cow's milk:fifth revision.J dairy sci,67:1599_1631

Emilia Curotto,Gustavo Gonzalez,Sybil O'Reilly and Guillermina Tapia.,(1989).Isolation and partial characterization of a protease from Cucurbita Ficifolia.Vol 243,pages 363-365.

Ernstrom C.A. (1983) Milk clotting enzymes and their action in fundamentals of dairy chemistry. Webb B.H., AH. Johnson and J.A. Alford . The Avi Publishing company Inc. 2nd Edition. PP 663-718.

F

FAO, (2002).Lait et produit laitiers dans la nutrition humaine.Collection FAO/Alimentation et nutrition .28,7 p.

Flueler O and Puhon Z (1978) Neue Erkenntnisse über die Labtragheit der Milch.Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung 7 :61-68.

Fox P., (2003). Milk proteins: general and historical aspects. Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins, Springer: 1-48.

G

Gastaldi E, Pellegrini O, Lagaude A and la Fuente BT (1994) Functions of added calcium in acid milk coagulation. *Journal of food science* 59 :310-312.

Gordin S. and Rosenthal I. (1978). Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *Journal of food protection* September Vol. 41 N° 9 (684-688).

Green, M. L. and A. Stackpoole (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.

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

H

Harboe M, M.L. Broe and K.B. Qvist.,(2010). The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants. in (Barry A. Law and A.Y. Tamime), *Technology of Cheesemaking*. Blackwell Publishing Ltd, pages 98-129.

Horne D and Banks J., (2004) Rennet-induced coagulation of milk. *Cheese : Chemistry, physics and microbiology* 1 :47-70.

Huppertz, T., V. Upadhyay, et al. (2006). *Constituents and Properties of Milk from Different Species. Brined cheeses*, Blackwell Publishing Ltd.

Hyslop DP, Richardson T and Ryan DS.,(1979) Kinetics of pepsin-initiated coagulation of k-casein. *Biochimica et biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 566 :390-396.

J

Jean-pierreraufman., (2004). Pepsin. in (Leonard R. Johnson), *encyclopedia of Gastroenterology*. Elsevier Inc, USA, Pages 147-148.

Jean-claude collin.,(2015). *présures et coagulants de substitution*. édition quae, France, 7-192.

Jeantet R, Croguennec T, Schuck P, Brule G., (2007). Sciences des aliments : technologie des produits alimentaires. Tec et Doc. Lavoisier. 456 pages.

K

Kennedy.,(2011).caseins.in (G.O. Phillips and P.A. Williams), Handbook of food proteins, Woodhead Publishing Limited, Ireland, Pages 13-29

KHoualdi G.,(2017).caractérisation du fromage traditionnel algérien «Meghissa ». Mémoire de magister en science alimentaire de biotechnologie et génie industrie alimentaire, institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agroalimentaires, université des frères Mentouri, Constantine. p96

Kopelman I and Cogan U (1976) Determination of clotting power of milk clotting enzymes. Journal of dairy science 59:196-199

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**(1-2): 63-72.

L

Lambert-faivre .y. (1988). Droit des assurances, 6ème édition, DALLOZ, Paris, 772p.

Libouga, D., D. Vercaigne-Marko, et al. (2006). "Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*." Tropicult **24**(4): 229-238.

Lira Saade et S. MontesHernández.,(1994).courges.In(J.E Hernández Bermejo et j. León), Cultures marginalisées 1492: une autre perspective. Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, pages 65-79 .

Lopez M, Lomholt S and Qvist K (1998) Rheological properties and cutting time of rennet gels. Effet of pH and enzyme concentration. International Dairy Journal **8** :289-293.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." Journal of biological chemistry **193**: 265-275.

M

Madhu, C. S., & Sharada, A. C. (2019). *Fibrinogenolytic activity of serine proteases(s) from Cucumis dipsaceus. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* Elsevier Ltd,India,Vol 17,Pages 685-689.

Mahaut M., Jeantet R. et Brulé G., (2003). *Initiation à la technologie fromagère.* Paris, Lavoisier, Technique Et Documentation, Lavoisier, France ; Pp 24-102.

Masfufatun, (2009) Isolasi dan Karakterisasi enzim selilase. <http://fk.uwks.ac.id/archive/journal/vol>. [12june2019].

Mazorra-Manzano M.A., Moreno-Hernández J.M., Ramírez-Suarez J.C. (2018). Milk-Clotting Plant Proteases for Cheesemaking. In: Guevara M., Daleo G. (eds) *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes.* Springer, Cham, 21-41.

Mechakra A,Auberger B,Remeuf F and Lenoir J (1999).optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par penicillium camemberti.sciences des aliments 19 :663-675.

Mohamed Ahmed, I. A., Babiker, E. E., & Mori, N. (2010). *pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from Solanum dubium seeds and its enzymatic action on bovine caseins. LWT - Food Science and Technology, 43(5), 759–764.*

Montilla A,Balcones E,Olano A and Calvo MM.,(1995) Influence of heat treatments on whey protein denaturation and rennet clotting properties of cow's and goat's milk.Journal of agricultural and food chemistry 43 :1908-1911.

Murlidhar, M., Anusha, R., & Bindhu, O. S. (2017). Plant-based coagulants in cheese making. In *Dairy engineering* (pp. 51–84). Apple Academic Press.

N

Najera A,De Renobales M and Barron L (2003) Effet pf ph,temperature,CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk:a multifactorial study.food chemistry 80:345-352.

Nouani, A., E. Dako, et al. (2009). "Characterization of the purified coagulant extracts derived from Artichoke Flowers (*Cynara scolymus*) and from the Fig Tree Latex (*Ficus*

carica) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria." J. Food Technol 7(1): 20-29.

O

Özer, B., E. Akardere, et al. (2010). "Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato." Biochemical Engineering Journal 50(3): 110-115.

P

Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney. (2017) ,chapitre1:Cheese An overview .in cheese Chemistry, Physics and Microbiology,4^e édition :Elsevier Ltd. Ireland,Pages 781-808.

R

Ramesh C. Chandan.,(2014).Cheese in the Marketplace.In (Carl A. Batt and Mary Lou Tortorello), Encyclopedia of Food Microbiology,Elsevier Ltd,USA,pages 384-394

Robitaille G,Lapointe C,Leclerc D and Britten M (2012) Effet of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropeptide on Escherichia coli and Lactobacillus rhamnosus in acidic conditions.Journal of dairy science 95:1-8.

Romain J., Thomas C, Michel M., Pierre S., Gérard B.,(2008).Laits de consommation.Les produits laitiers.3^{ème}édition. Lavoisier, paris, p.1-21

Rick Wirnt., (1956). Pepsin, Pepsinogen, Uropepsinogen. In (Hans-Ulrich Bergmeyer), Methods of Enzymatic Analysis (Second Printing, Revised). Academic Press, 819-823.

Ramet P J., (1997). Fromage. In () les agents de transformation du lait, (3^{ème} édition). Lavoisier, 165-174.

Ramet P J.,(1997). Les agents de transformation du lait; la présure et les enzymes coagulantes In: Le Fromage. Ed., A. Eck, 3^{ème} Ed., Tec Et Doc, Lavoisier, P.101-107, 539p

Ramat P J., Weber F., (1980).Purification à l'étude de l'influence des facteurs du milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. Le lait, 60,1-13.

S

Shah, M. A., S. A. Mir, et al. (2014). "Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review." *Dairy Science & Technology* **94**(1): 5-16.

Sharma, A., Kumari, M., & Jagannadham, M. V. (2012). *Religosin C, a cucumisin-like serine protease from Ficus religiosa. Process Biochemistry*, *47*(6), 914–921.

Simões I., Faro C., (2004). Structure and Function of Plant Aspartic Proteinases. *Eur. J. Biochem.* *271*: 206–207.

Solomon Habtemariam.,(2019). The chemical and pharmacological basis of pumpkins (*Cucurbita species*) as potential therapy for type-2 diabetes. *Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases*. Elsevier Ltd., London, Pages 473-502

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

T

Tang Jordan., (2013). Pepsin A. In (Neil D. Rawlings, Guy Salvesen), *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*. Academic Press, 27-35

Tervala H-L, Antila V and Syvajarvi J(1986) Factors affecting the renneting properties of milk.

Therese Uniacke-Lowe, Patrick F, Fox., (2017). Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties. In (Paul L.H. McSweeney, Patrick F. Fox, Paul D. Cotter, David W. Everett), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, 69-113.

Tsouli , J. (1979): Etude d'une protease coagulante extraite de *Cynara scolymus* et de *Cynara cardunculus*, adaptation de la méthode conductimétrique pour la détermination du temps de coagulation du lait et le contrôle des fabrications. Doctorates-sci., Univ. C. Bernard, Lyon :1-62.

V

Vanier P. (2007). La citrouille au fil du temps, usages culinaires, conservation, jardinage, biologique. Ecologie et environnement.

Vetier., Banon S., Ramet J.P., Hardy J., (2000).Hydratation des micelles de caséine et structure fractale des agrégats et des gels de lait. Le lait, 80,237-246.

Vierling Elisabeth., (2008).Aliment et boissons Filières et produits 3PémeP édition 22,23p.

Vilain Anne- christine., (2010), Qu'est-ce que le lait. revue Française d'Allergologie, volume50, Pages 124-127.

Vignola C.L., (2002)Science et technologie du lait –Transformation du lait, École polytechnique de Montréal, ISBN: 29-34 (600pages).

W

Walstra, P. (1999). Dairy technology: principles of milk properties and processes, CRC Press.

Y

Yang Y, Shen D, Long Y, Xie Z and Zheng H (2017) Intrinsic peroxidase-like activity of dicin. Scientific reports 7:43141.

Z

Ziaul Amina.M, Tahera Islama, M. Rasel Uddina, M. Jashim Uddinb, M. Mashiar Rahmana, M. Abdus Satter., (2019). Comparative study on nutrient contents in the different parts of indigenous and hybrid varieties of pumpkin (*Cucurbita maxima* Linn.) . Heliyon, Volume 5. e02462

Annexes

Annexe I : Dosage des protéines par la méthode (Bradford, 1976).

I-1 Préparation de réactif de BRADFORD

- 100 mg de bleu de Coomassie G-250 ;
- 50ml de l'éthanol à 95% ;
- 100ml d'acide phosphorique à 85% ;
- compléter avec l'eau distillée jusqu'à un volume de 1000ml ;

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 albumine bovine (BSA) (1mg/ml) selon les quantités suivantes : 0, 100, 200, 300,400 et 500 ml. 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 500 ml. Après addition de 2ml du réactif de Bradford et agitation, la solution est laissée à l'obscurité 15min puis l'absorbance est mesurée à 595nm 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 (ul)	0	100	200	300	400	500
Eau distillée (ul)	500	400	300	200	100	0
Total (ul)	500	500	500	500	500	500
Réactif Bradford (ul)	2000					

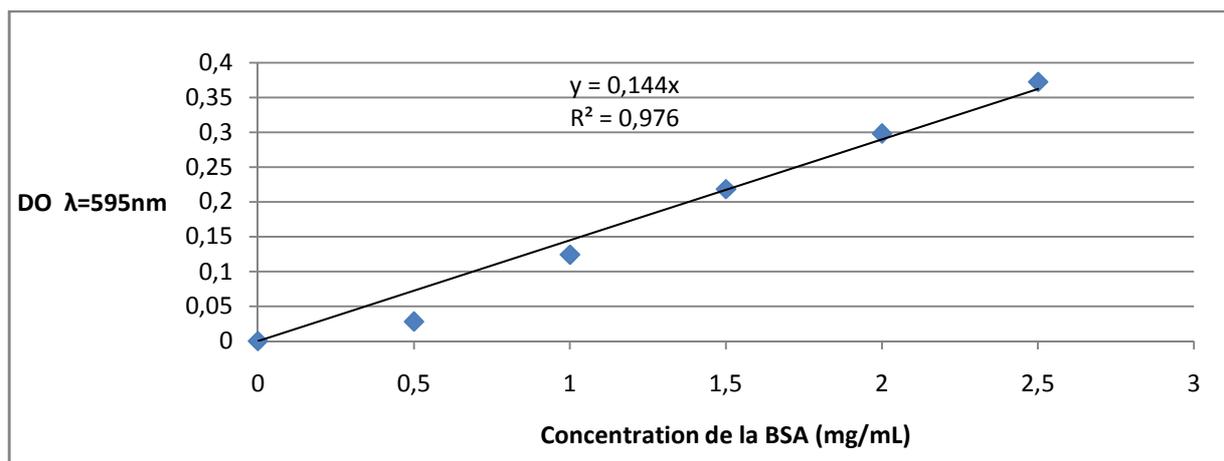


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de la solution de SAB (1mg/ml) Bradford.(1976).

Annexe II : Mesure de l'activité Protéolytique

II-1 Courbe d'étalonnage de la tyrosine

Tableau II : Préparation de la gamme d'étalonnage de la Tyrosine (250ug/ml)

N tube	Blanc	1	2	3	4	5
Dilution	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Tyrosine (ul)	0	100	200	300	400	500
Tampon phosphate 0,1M pH 7 (ul)	500	400	300	200	100	0
Solution C (ml)	2,5					
Incubation à 35°C pendant 10min						
Folin-Ciocalteu (ul)	250					
Incubation à 35°C pendant 10min						
Lire l'absorbance à 660nm						

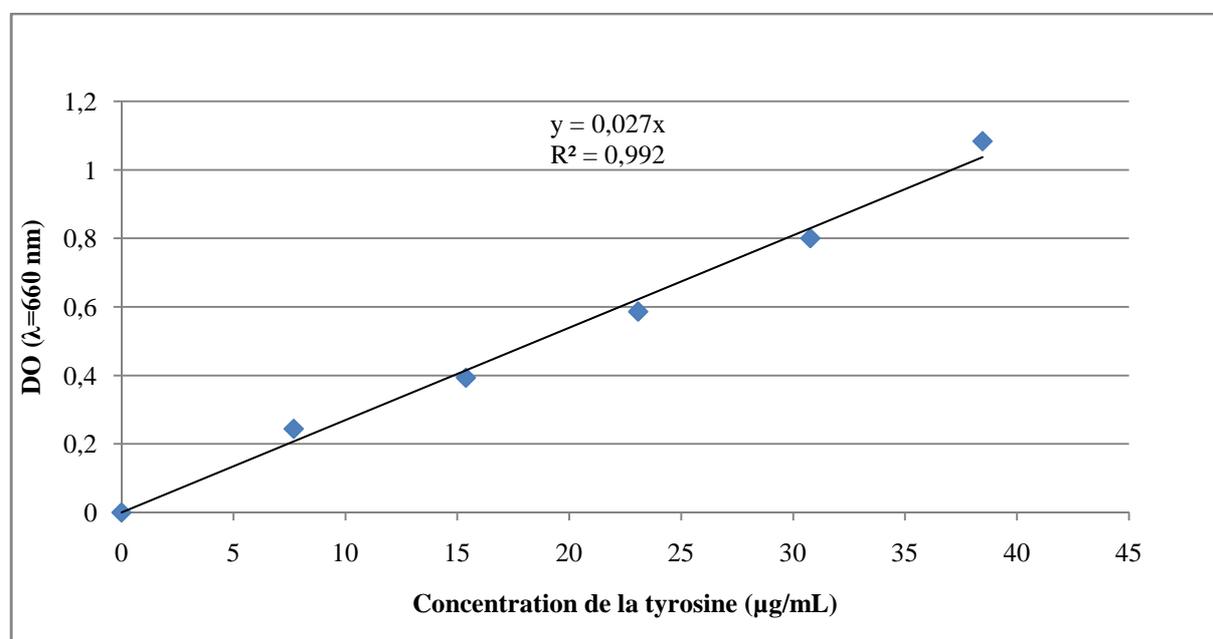


Figure 2 : Courbe d'étalonnage obtenu avec la Tyrosine.

Résumé

L'objectif de la présente étude, est d'étudier la possibilité de substituer la présure par l'extrait enzymatique de la citrouille comme succédané de la présure. L'extraction de l'enzyme à partir des graines de la citrouille *Cucurbita Pepo*. et la caractérisation de l'extrait enzymatique obtenu par la détermination de l'activité coagulante, la force coagulante et l'activité protéolytique a été effectuée. Les paramètres optimaux à savoir le pH, la température, la concentration en CaCl₂, et leur influence sur l'activité enzymatique de l'extrait brut de la citrouille, ont été étudiés. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait de la citrouille présente une activité coagulante de 15,42 UP, une force coagulante de 3703, et une activité protéolytique estimée à 108,74 µg/ml/min d'équivalent tyrosine/ml /min d'extrait de l'extrait des graines de *Cucurbita Pepo*.

Mot clé : *Cucurbita Pepo*, succédané de la présure, activité enzymatique, force coagulante.

Abstract

The objective of the present study is to study the possibility of substituting rennet by the enzymatic extract of pumpkin as a rennet substitute. The extraction of the enzyme from the seeds of the pumpkin *Cucurbita Pepo*. and the characterization of the enzyme extract obtained by the determination of coagulant activity, coagulant force and proteolytic activity was performed. The optimal parameters, namely pH, temperature, CaCl₂ concentration, and their influence on the enzymatic activity of crude pumpkin extract, were studied. The results obtained showed that the pumpkin extract exhibits a coagulant activity of 15.42 PU, a coagulant force of 3703, and a proteolytic activity estimated at 108.74 µg / ml / min of tyrosine equivalent / ml / min extract of *Cucurbita Pepo* seed extract.

Key words: *Cucurbita Pepo*, rennet substitute, enzymatic activity, coagulant force.

