

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA –BEJAIA

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 de
MASTER

Option : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire

Thème

Recherche de succédanés de la présure d'origine animale et essai d'élaboration d'un fromage frais

Soutenu le : 13/09/2022

Présenté par :

MEZIANI Fairouz et OUIDIR Kenza

Jury

Président :	M^{me} OUCHEMOUKH N.	MCA
Promoteur :	M^r BOUKHALFA F.	MCA
Examineur :	M^{me} BRAHMI N.	MCA

Année universitaire : 2021 / 2022

Remerciements

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

Qu'il nous soit permis d'exprimer notre reconnaissance à notre enseignant et promoteur, **Mr. BOUKHALFA F.**, pour avoir accepté de diriger ce travail. Nous le remercions également pour la confiance qu'il nous a témoignée. Qu'il veuille trouver ici notre estime, notre gratitude et notre respect.

Notre profond respect va à notre enseignante, **Mme. OUCHEMOUKH N.**, pour avoir accepté de présider le jury et d'apprécier la qualité de notre travail. Nous tenons à remercier **Mme. BRAHMI N.**, pour avoir accepté de porter un jugement éclairé et d'examiner notre travail.

Nous exprimons notre reconnaissance à **Mlle. KERRACHE L.**, Ingénieur du laboratoire de Génie Biologique pour son aide et sa disponibilité à tout moment.

Toute notre reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à la réalisation de notre mémoire. Nos remerciements vont également à tous nos amis et camarades du laboratoire technologie alimentaire qui, à diverses reprises, ont manifesté leur soutien et leurs amitiés.

Dédicace

Je dédie ce mémoire A mes chers parents avec tous mes sentiments de respect, d'amour, de gratitude et de reconnaissance pour tous leurs sacrifices déployés pour m'élever dignement et assurer mon éducation dans les meilleures conditions, pour leur soutien tout au long de ma vie. Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués et le fruit de votre soutien infailible !

*A mes chères sœurs **Thinhinane** et **Thilelli** a lesquelles je souhaite toute la réussite, mes cousines **Lily** et **Mouma** pour son encouragement permanent et son soutien moral.*

*A ma très chère tante **Saliha**.*

*A mon cher mari **Adem**, qui a toujours su trouver les mots pour me relever me motiver et me soutenir et m'incité à faire de mon mieux, tout au long de mon parcours.*

*A la mémoire de ma **grand-mère**, mon **grand-père**, mon **beau-père**, et **Na Hayet**.*

*A ma binôme **Fairouz**. Mes sincères vœux de réussite et bonheur*

A mes amies avec lesquelles j'ai partagé de merveilleux moments et mes camarades du laboratoire technologie alimentaire.

***Kenza**.*

Dédicaces

Je tiens à dédier ce travail à la reine de ma vie « MAMA » qui a été toujours là pour moi, je la remercie pour tous ses soucis et sacrifices et surtout les efforts qu'elle a fait pour moi tout au long de mes études et surtout mon travail de fin d'étude.

A la mémoire de celui qui a fait de moi une femme, mon très cher père (que dieu l'accueille dans son immense paradis)

A mes chères sœurs Lamia, Assia, Karima, Mounira et Sarah

A mes chers frères Mohamed et Yacine

A mon très cher mari Yanis qui m'a soutenu tout au long de ce travail

A ma très chère copine Adouda qui a été toujours là pour moi

A ma belle-famille et spécialement mon beau père Djilali

A ma binôme Kenza. Mes sincères vœux de réussite et bonheur

A tous ceux qui m'ont aidé de près et de loin.

Fairouz

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

Partie bibliographique

I-Généralité sur le lait 03

II-Coagulation du lait 04

II.1. coagulation acide 05

II.2. coagulation enzymatique 06

II.3. coagulation mixte 07

III-Présure et coagulation 08

III.1. la présure 08

III.2. Les présure de remplacements 08

III.2.1. les succédanés d'origine végétale..... 08

III.2.2. les succédanés d'origine microbienne 09

III.2.3. les succédanés d'origine animale..... 09

Partie pratique

Matériel et méthodes

I.Matière première 12

I.1. le lait..... 12

I.2. la présure 12

I.3. matériel animale 12

I.3.1. Les proventricules de poulet 12

I.3.2. Les viscères de poisson..... 13

II. Procédés d'extraction de la pepsine..... 13

II.1. Pepsine avicole 13

II.2. Pepsine Chinchard 14

III. Caractérisation physico-chimique des extraits enzymatiques bruts	16
III.1 Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques	16
III.2 Mesure des activités enzymatiques	16
III.2.1 Détermination de l'activité protéolytique	17
III.2.2 Mesure de l'Activité coagulante	18
IV. Etude des paramètres influençant l'activité enzymatique	19
IV.1. Effet de la température sur l'activité coagulante.....	19
IV.2. Effet du potentiel hydrogène (pH) sur l'activité coagulante.....	20
IV.3. Effet de la concentration de chlorure de calcium (CaCl ₂) sur l'activité coagulante.....	20
IV.4. Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante	20
V. Elaboration d'un fromage frais par les extraits étudiés et par la présure	21
VI. Analyse sensorielle des fromages	22

Résultats et discussion

I.Caractéristiques des extraits enzymatiques étudiés	23
I.1. Dosage des protéines de l'extrait enzymatique.....	24
I.2. Activité protéolytique	25
I.3. Activité coagulante	26
II. Détermination des conditions optimales de coagulation des extraits enzymatiques étudiées	27
II.1. Effet de la température sur l'activité coagulante	27
II.2. Effet du pH sur l'activité coagulante	29
II.3. Effet de la concentration de Cacl ₂ sur l'activité coagulante	30
II.4. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité coagulante.....	31
III- Analyse sensorielle	32

Conclusion

Conclusion.....	36
-----------------	----

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

Partie bibliographique

I-Généralité sur le lait 03

II-Coagulation du lait 04

II.1. coagulation acide 05

II.2. coagulation enzymatique 06

II.3. coagulation mixte 07

III-Présure et coagulation 08

III.1. la présure 08

III.2. Les présure de remplacements 08

III.2.1. les succédanés d'origine végétale..... 08

III.2.2. les succédanés d'origine microbienne 09

III.2.3. les succédanés d'origine animale..... 09

Partie pratique

Matériel et méthodes

I.Matière première 12

I.1. le lait..... 12

I.2. la présure..... 12

I.3. matériel animale..... 12

I.3.1. Les proventricules de poulet 12

I.3.2. Les viscères de poisson..... 13

II. Procédés d'extraction de la pepsine..... 13

II.1. Pepsine avicole 13

II.2. Pepsine Chinchard 14

III. Caractérisation physico-chimique des extraits enzymatiques bruts	16
III.1 Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques	16
III.2 Mesure des activités enzymatiques	16
III.2.1 Détermination de l'activité protéolytique	17
III.2.2 Mesure de l'Activité coagulante	18
IV. Etude des paramètres influençant l'activité enzymatique	19
IV.1. Effet de la température sur l'activité coagulante.....	19
IV.2. Effet du potentiel hydrogène (pH) sur l'activité coagulante.....	20
IV.3. Effet de la concentration de chlorure de calcium (CaCl ₂) sur l'activité coagulante.....	20
IV.4. Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante	20
V. Elaboration d'un fromage frais par les extrais étudiés et par la présure	21
VI. Analyse sensorielle des fromages	22

Résultats et discussion

I.Caractéristiques des extraits enzymatiques étudiés	23
I.1. Dosage des protéines de l'extrait enzymatique.....	24
I.2. Activité protéolytique	25
I.3. Activité coagulante	26
II. Détermination des conditions optimales de coagulation des extraits enzymatiques étudiées	27
II.1. Effet de la température sur l'activité coagulante	27
II.2. Effet du pH sur l'activité coagulante	29
II.3. Effet de la concentration de Cacl ₂ sur l'activité coagulante	30
II.4. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité coagulante.....	31
III- Analyse sensorielle	32

Conclusion

Conclusion.....	36
-----------------	----

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

AFNOR : Association national des normalisations

BSA : Bovin Sérum Albumine

CMP : Caséinomacropeptide

DLC: Date Limite de Consommation

FAO: Food and Agriculture Organization

FIL : Fédération Internationale du Lait

ISO: International Standard Organization

MG : Matière Grasse

ONS : Office national des statistiques

pH : Potentiel d'Hydrogène

TCA: Tri Chloroacetic Acid

U.A.C : Unité d'Activité Coagulante

U.P : Unité Présure

Liste des figures

Figure 1 : schéma représentatif du modèle de formation des micelles selon Schmidt.....	05
Figure 2 : hydrolyse de la caséine κ sous l'action de la présure	06
Figure 3 : évolution de taux d'hydrolyse de la caséine κ et de la viscosité du lait au cours des différentes phases de sa coagulation par action de la présure	07
Figure 4 : photographie de pro-ventricules du poulet	13
Figure 5 : photographie et schéma du système digestif et de l'estomac du poisson.....	13
Figure 6 : diagramme d'extraction de la pepsine de poulet	14
Figure 7 : diagramme d'extraction de la pepsine du Chinchard	15
Figure 8 : photographie des extraits bruts étudiés.....	15
Figure 9 : photographie des échantillons de fromages frais obtenus	21
Figure 10 : taux de protéines des extraits enzymatiques étudiés	24
Figure 11 : Activité protéolytique et protéolytique spécifique des extraits enzymatiques étudiés.....	25
Figure 12 : Activité coagulante des extraits étudiés.....	26
Figure 13 : représentation graphique de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés	28
Figure 14 : représentation graphique de l'effet du pH sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.....	29
Figure 15 : représentation graphique de l'effet du CaCl_2 sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.....	31
Figure 16 : représentation graphique de l'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante	32
Figure 17 : histogrammes des résultats de l'analyse sensorielle des trois fromages étudiés ..	34
Figure 18 : histogramme de préférence des dégustateurs des fromages élaborés	35

Liste des tableaux

Tableau I : Composition moyenne du lait de vache	04
Tableau II : résultats de la caractéristique physicochimique des extraits enzymatiques étudiés	23

Introduction

Le lait par ces grandes qualités nutritionnelles, a toujours été considéré comme un aliment à part entière, mais sa consommation a souvent été limitée en raison de sa grande instabilité, l'irrégularité de sa production attachée au caractère saisonnier, et sa grande fragilité. Ceci a incité des producteurs à rechercher d'autres formes pour préserver ses qualités nutritionnelles ainsi que de prolonger sa disponibilité dans le temps ce qui a conduit à l'apparition de la technologie fromagère (**Jeantet et al., 2017**)

Le fromage, l'étape clé de sa réussite est la coagulation, qui se traduit par la formation d'un gel résultant des modifications physico-chimiques intervenant au niveau des micelles de caséine. Les propriétés de ce gel formé diffèrent selon la nature de l'agent coagulant ; deux types de coagulation existent, l'une acide réalisé à l'aide de ferments lactiques par dégradation du lactose en acide lactique, et l'autre enzymatique par dégradation de la caséine k par la présure ou autre succédané (**Alias, 1984**).

La présure de veau est l'agent coagulant le plus utilisé. C'est l'extrait de la caillette de veau non sevré, qui comprend la chymosine, enzyme majoritaire, et la pepsine (**Desmazeaud, 1997**).

La production mondiale la présure connaît une pénurie croissante, dont sa pénurie est due essentiellement à une augmentation croissante de la production et la consommation du fromage et l'impossibilité d'augmenter en parallèle la production de présure ce qu'ont provoqué des fluctuations très importantes dans son prix (**Cuvellier, 1993**).

Ces problèmes sont aggravés dans plusieurs pays vu les raisons religieuses dues aux rituelles de l'abattage et l'interdiction de certains agents coagulantes tels que la pepsine porcine. Face à cette situation, de nombreuses recherches ont été entreprises afin de trouver des succédanés efficaces et compétitifs utilisables industriellement.

Parmi ces succédanés les plus anciens sont des protéases d'origine végétale employées dans des préparations traditionnelles. Pour pallier le déficit en présure, d'autres ont été envisager, tels que les protéases d'origine fongique, des succédanés d'origine animale tels que les pepsines gastriques de certains animaux (**Gordin et Rosenthal, 1978 ; Green et al., 1984 ; Emmon et al., 1990**). La pepsine extraite d'estomac de poisson (la morue de l'atlantique) (**Haard et al. 1982 ; Cuvellier, 1993**).

Selon l'office national des statistiques, la production de l'industrie fromagère en Algérie est passée de 20 milles tonnes en 2006 à 30 milles tonnes en 2011 (**ONS, 2012**).

Vu la pénurie mondiale de la présure son importation présente un handicap majeur pour le développement de la production en Algérie, le choix de succédané de présure de production locale est souhaitable. Il permettrait un approvisionnement permanent limitant la dépendance avec l'importation.

La production d'enzymes coagulants le lait à partir de proventricules de volailles et de viscères de poissons présente un intérêt industriel. En effet elle constitue l'une des voies de la valorisation des coproduits d'abattage avicole et marine.

Ces succédanés qui font l'objet de cette d'étude, peuvent-être obtenus à partir de matières premières locales et avec des prix convenables du fait que les abats de volailles et les viscères de poisson sont disponibles et ne sont pas valorisés dans notre pays.

Notre travail porte sur :

- La valorisation des abats de poulet de chair et des viscères de poisson
- L'évaluation de la possibilité d'extraction de pepsine.
- L'estimation des propriétés coagulantes et de l'activité protéolytique de la pepsine en tant que succédané de présure.

Afin d'atteindre l'objectif tracé, ce travail est divisé en deux partie. La première est une étude bibliographique et la seconde est une partie pratique divisée en deux sections, à savoir matériel et méthode et discussion des résultats.

Dans de la partie bibliographique, un aspect générale est donné pour les trois principaux volets ; le lait, la coagulation du lait et les présures de remplacement.

Au cours de la partie pratique, la collecte des matières premières animales (proventricules de poulet et viscères de poisson), extraction et caractérisation des extraits brut et comparaison avec la présure industrielle, l'élaboration d'un fromage frais et comparaison par une analyse sensorielle, ainsi que la présentation des différents résultats obtenus.

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

I- Généralités sur le lait

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le congrès international de la répression des fraudes : « Le lait est 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 » (**Luquet, 1985**).

Le lait et les produits laitiers occupent une place prépondérante dans l'alimentation humaine. Il est symbole de fertilité, richesse et abondance. C'est un aliment de couleur blanchâtre produit par les cellules sécrétrices des glandes mammaires des mammifères femelles. Le lait sécrété dans les premiers jours après la parturition s'appelle le colostrum. (**Vilain, 2010**)

La dénomination « lait » sans indication de l'espèce animale de provenance est réservée au lait de vache. Tout lait d'une femelle laitière autre que la vache doit être désigné par la dénomination lait suivi de l'indication de l'espèce animale dont il provient (**J.O.R.A, 2003**).

Le lait est un produit fortement altérable que ce soit par voie microbienne mais également par voie enzymatique. C'est un milieu multiphasique avec une phase aqueuse contenant essentiellement le lactose et les minéraux, une phase dispersée de nature lipidique (émulsion de globules gras) et une phase de protéique formée majoritairement par les micelles de caséines.

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

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

Les lipides sont constitués d'un mélange d'acides gras en suspension dans le lait sous forme de gouttelettes formant une émulsion constituée à 99 % de triglycérides. Ces lipides constituent la partie la plus variable du lait et varient de 10 à 500 g/l en fonction des espèces (**Vilain, 2010**).

Tableau I : Composition moyenne du lait de vache(Filion, 2006)

Constituants	Teneurs (g/l)
Constituants minéraux	
• Eau	902
• Constituants salin minéraux	6.9
• Gaz dissous	0.1
Constituants organiques	
• Constituants salins	1.7
• Lactose	49
• Matière grasse	38
Constituants azotée protéiques	
• Protéines	32
• Caséines	26
• Protéines solubles	6
Constituants azotés non protéiques	1.5

II- Coagulation du lait

La coagulation résulte d'un changement irréversible du lait de l'état liquide à l'état semi-solide appelé gel ou coagulum. Les caractéristiques physico-chimiques du gel conditionnent l'aptitude à l'égouttage et les caractéristiques finales du fromage. (Mahaut et al.,2000)

Le substrat spécifique intéressé par le phénomène de coagulation dans le lait est constitué par les protéines, essentiellement représentées par les caséines. Ces dernières sont des phosphoprotéines qui représentent environ 80% des protéines totale du lait bovin, ovin et caprin, et entre 52 et 87% des protéines totale du lait camelin (Al-Kanhal,2010),et seulement 40% du lait humain (Hipp et al.,1952 ;Mehaia et al.,1995).

Ces caséines sont présentes dans le lait sous forme de particules colloïdales nommées micelles de caséine. Plusieurs modèles ont été proposés, les hypothèses les plus admises sont celles de Schmidt (1982). Ce dernier schématise(Figure1) la micelle serait constituée d'un ensemble de sous unités appelée les submicelles de nature exclusivement protéique et de composition variable, associées les unes aux autres par des éléments minéraux (phosphate de

calcium et magnésium). Ces submicelles auraient un cœur hydrophobe, formée par des parties apolaires de caséines et une enveloppe hydrophile de nature polaire, composée de segments de chaînes hautement chargées avec, d'autre part, les résidus phosphoséryls des caséines α s1, α s2 et β et une partie COOH terminale de la caséine κ . (Meitton et al., 1994)

Les submicelles sont organisées de telle manière que les pôles hydrophobes soient à l'intermédiaire du calcium et du phosphate minéral. La caséine localisée à l'intérieur de la micelle, joue un rôle protecteur grâce à sa faible teneur en phosphore et sa richesse en glucides. Elle est hydrophile et assure la stabilité de la micelle (Gourseaud, 1993).

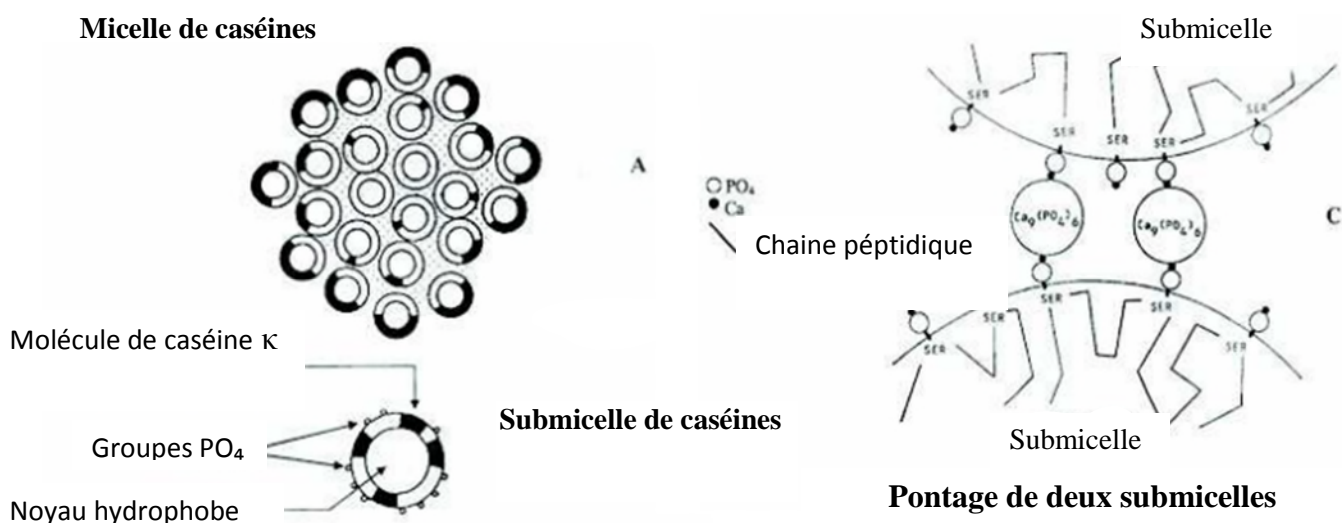


Figure 1 :Schéma représentatif du modèle de formation des micelles selon Schmidt (1980). (Ramet 1990)

On distingue deux types de coagulations : 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. Les mécanismes d'action de ces deux agents coagulants au niveau de la micelle sont très différents. Bien qu'ils conduisent tous les deux à la formation d'un coagulum (gel ou caillé), les propriétés rhéologiques de ce dernier restent caractéristiques du mode de coagulation (Farkye,2004;JanhØjET Qvist,2010)

II.1. Coagulation acide

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique (pHi=4,6) par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique ou par

acidification chimique (injection de CO₂ ou addition de gluconolactone) ou encore par ajout de protéines sériques à pH acide. (Mahaut et al., 2000)

L'acidification entraîne une diminution des charges négatives des micelles et donc une diminution de la couche d'hydratation et des repulsions électrostatiques, ainsi qu'une solubilisation du calcium et du phosphore minérale, entraînant une destruction des micelles de caséines avec réorganisation protéique formé un réseau puis un gel à (pH4,6). (Mahaut et al., 2000)

Le gel formé présente une perméabilité satisfaisante, mais une friabilité élevée avec une élasticité et plasticité pratiquement nulles dues au manque de structuration du réseau. Les liaisons sont de faibles énergies de type hydrophobe et résistent peu aux traitements mécaniques. (Mahaut et al., 2000)

II.2. Coagulation enzymatique

Elle consiste à transformer le lait de l'état liquide à l'état de gel par action d'enzymes protéolytiques le plus souvent d'origine animale (Mahaut et al., 2000). Son mécanisme d'action est assez bien établi et comporte trois phases. (Walstra and Jenness, 1984)

La phase primaire ou enzymatique déclenche la coagulation par hydrolyse de la caséine au niveau de la liaison (Phe105-Met106), (Mahaut et al., 2000) il y'a libération de paracaséine κ hydrophobe (fragment 1-105) (Tunick, 2008) ; et la caséino-macropeptide hydrophile (CMP fragment 106-169) (figure 2). La paracaséine-κ liée aux caséines α et β reste intégrée à la micelle hydrophobe et le CMP contenant tous les glucides est libéré dans le lactosérum. (Li and Dalglish, 2006)

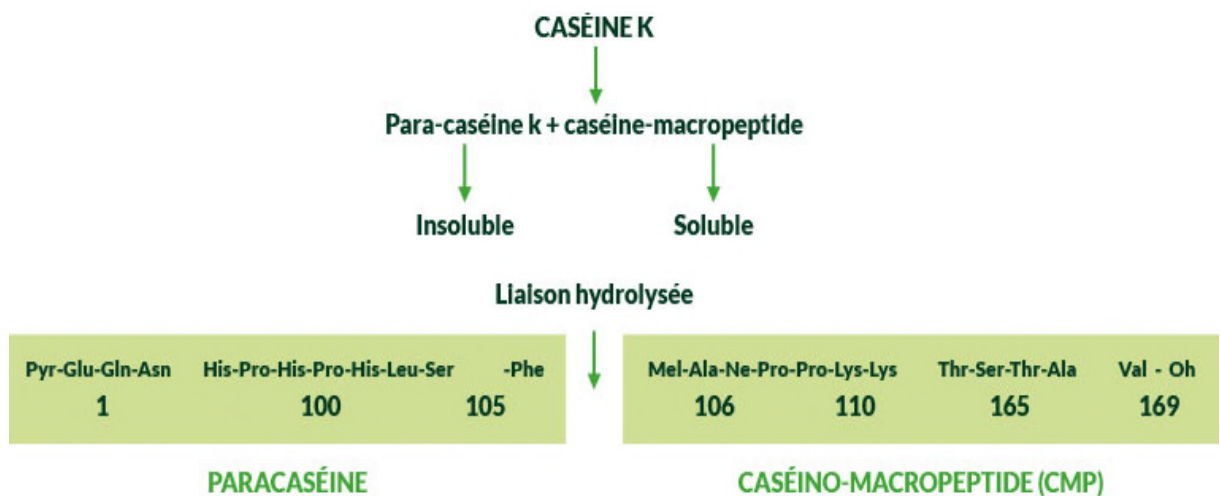


Figure 2 : Hydrolyse de la caséine κ sous l'action de la présure.

Une phase secondaire qui correspond à la coagulation proprement dite. Elle commence lorsque, à pH 6,6, 80 à 90% de la caséine est hydrolysée. Le CMP se détache de la caséine et la micelle perd son caractère hydrophile ; il y a diminution de son degré d'hydratation. Des liaisons hydrophobes et électrostatiques s'établissent entre les micelles modifiées qui vont entraîner la formation du gel. (Mahaut et al., 2000) Ces derniers constituent le gel protéique qui se sépare nettement du lactosérum (Lucey, 2002).

A ces deux phases s'ajoutent une phase tertiaire ; les micelles agrégées subissent de profonde réorganisation par la mise en place de liaisons phosphocalciques et peut être des ponts disulfures entre les paracaséines (Mahaut et al., 2000).

L'évolution de taux d'hydrolyse de la caséine κ et de la viscosité du lait au cours des différentes phases de sa coagulation par action de la présure est représenté dans la figure suivante :

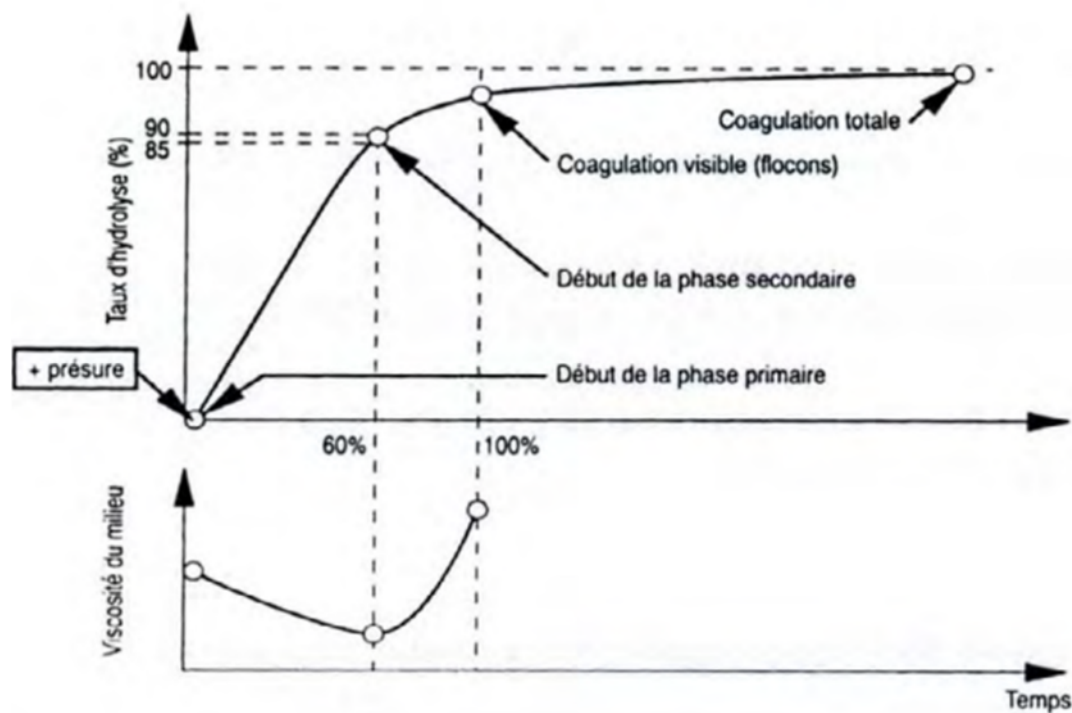


Figure 3 : Evolution de taux d'hydrolyse de la caséine κ et de la viscosité du lait au cours des différentes phases de sa coagulation par action de la présure (Mahaut et al., 2000).

II.3. Coagulation mixte

La coagulation mixte est réalisée par acidification de lait et addition d'enzymes coagulantes. En pratique, cette méthode est utilisée pour la fabrication des fromages frais ou fromages à pâte

molle (Cheftel et Cheftel, 1977 ; Wigley, 1996). Le coagulum obtenu présente des caractères intermédiaires entre ceux de gel lactique et présure. Il est caractérisé par une souplesse et une élasticité moins grande, une fermeté et friabilité plus accentuées que celle du gel présure (Veisseyre, 1975 ; Jeantet *et al.*, 2008).

III. Présure et coagulation

III.1. La présure

Selon la fédération internationale du lait (FIL) la dénomination « présure » est donnée à l'extrait coagulant provenant des caillottes de jeunes ruminants abattus avant sevrage (Ramet, 1985 ; Andren, 2002), Traditionnellement utilisé pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de la majorité des fromages (Alais, 1984 ; Wigley, 1996). La présure se compose de deux fractions, une partie majeure de chymosine (80%) et une partie mineure de pepsine (20%) (Scott, 1981 ; Huppertz *et al.*, 2006).

III.2. Les présures de remplacement

La chymosine (EC 3.4.23.4) est l'agent de coagulation le plus utilisé par les industries laitières. Toutefois, elle couvre seulement 20 à 30% de la demande mondiale en coagulants (Jacob *et al.*, 2011). Depuis quelques années, face à l'augmentation systématique du prix de la chymosine, de nouveaux substituts ont été sélectionnés (Queiroz-Macedo *et al.*, 1993).

Les enzymes, pouvant remplacer la chymosine, appartiennent à la classe des protéases aspartiques (EC 3.4.23), appelées également protéases acides ou protéinases aspartiques. Ce sont des enzymes protéolytiques qui appartiennent à la famille des endopeptidases (Honjo *et al.*, 1990 ; Pan *et al.*, 1991 ; Garcia-carreno, 1992). Elles ont été trouvées chez les vertébrés, les végétaux (Lopes *et al.*, 1998), les micro-organismes (Arecas *et al.*, 1992) et chez les poissons (Shamsuzzaman et Haard, 1983; Haard, 1992).

En effet, les enzymes coagulants de remplacement doivent répondre à un certain nombre de conditions :

- ✓ L'activité protéolytique doit être faible comparativement à l'activité coagulante ;
- ✓ La spécificité protéolytique sur la β -caséine doit être faible, sinon l'amertume se produit dans le fromage (Dalglish, 1992) ;
- ✓ La pureté chimique et la qualité microbiologique doivent être élevées ;

✓ Le rendement fromager devrait être identique à celui de la présure (**Germonville, 2003**).

III.2.1. Les succédanés d'origine végétale

Les végétaux ont été les premiers objets de recherche en vue d'isoler les enzymes coagulantes. Celles-ci sont extraites par macération, de divers organes de plantes supérieures. Parmi les espèces européennes, on peut citer le gaillet (*Gallium verum*) et le cardon (*Cynaracardunculus*) qui ont été et sont encore utilisés dans des fabrications de fromages fermiers. En effet, les fleurs séchées de *Cynaracardunculus* ont été employées avec succès pendant des centaines d'années notamment en Portugal et en Espagne dans la préparation de certaines variétés de fromages traditionnels tels que Serra da Estrela et La Serena (**Macedo et al, 1993, Vioque et al., 2000, Sousa et Malcata, 2002**). D'autres enzymes coagulantes ont été extraites à partir de plantes tropicales. Les plus connues sont les ficines, extraites du latex du figuier (*Ficus caricas*), la papaine, extraite des feuilles du papayer (*Caricapapaya*), et la broméline, extraite des tiges d'ananas (*Ananas comasus*). (**Aworth et Nakai, 1986 ; Aworth et Muller, 1987**).

Ces protéases ont la propriété de coaguler le lait (**Garg et Johri, 1994**). Cependant, leur application dans la fabrication fromagère avec le lait de vache n'a pas eu de succès puisque ces enzymes protéolysent plus le lait qu'elles ne le coagulent (**Walstra et al., 1999**). Ces résultats se traduisent par certains inconvénients technologiques, marqués principalement par la baisse dans le rendement fromager et l'apparition de goût amer dans le produit fini (**Cuvellier 1993, Ramet, 1997a**).

III.2.2. Les succédanés d'origine microbienne

Depuis une trentaine d'années, une puissante industrie de transformation s'est développée dans le monde ; elle produit des substances variées, dont une grande quantité d'enzymes qui trouvent de nombreuses applications dans des secteurs industriels variés, et en particulier des protéases susceptibles de coaguler le lait (**Anonyme II**).

Des protéases d'origine bactérienne provenant de cultures en fermenteurs de Bacilles et de *Pseudomonas* ont donné en général des résultats décevants en raison de leur activité protéolytique généralement très élevée : aussi l'utilisation de ces enzymes bactériennes n'a pas dépassé le stade expérimental ; aucune préparation n'est commercialisée (**Anonyme II**).

Les enzymes d'origine fongique, au contraire, ont donné des résultats meilleurs, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure ; plusieurs préparations sont déjà commercialisées sur le marché international et utilisées à plus ou moins grande échelle selon les pays. Ces préparations proviennent de trois genres de moisissures, *Endothia parasitica* (E.p.), *Mucor pusillus* (M.p.) et *Mucor miehei* (M.m.). (Anonyme II)

III.2.3 Les succédanés d'origine animale

A côté des succédanés de présure d'origine végétale et microbienne, existe ceux d'origine animale. (Alais, 1984, Ramet, 1997a). La pepsine est l'une des protéases d'origine animale qui ont fait l'objet d'expérimentation en vue d'une utilisation potentielle en industrie fromagère comme succédanés de la présure. En effet, les pepsines de quelques espèces tels que la pepsine bovine, caprine et de poulet sont déjà employées depuis des dizaines d'années ; La pepsine est efficace pour rompre les liaisons peptidiques entre les acides aminés hydrophobes et aromatiques. (Anonyme II)

Les propriétés protéolytiques de la pepsine bovine sur les caséines sont plus semblables à celles de la chymosine (Ernstrom et Wong, 1983 ; Barbano et Rasmussen, 1992). La pepsine porcine est une protéase à caractère plus acide que la chymosine, son activité est bonne en milieu acide, mais décroît fortement au-dessus du pH 6,3 ; au pH du lait frais, la coagulation n'apparaît pas. (Anonyme II)

En Algérie, une étude a montré que les abats de poulet et plus particulièrement, le proventricule de poulet (*Gallus gallus*) pouvait constituer une source potentielle de coagulases. En effet, Morsli (1997) a pu extraire une protéase qui a conduit à la fabrication d'un fromage à pâte molle (Camembert) dont la qualité organoleptique ainsi que le rendement étaient comparables aux fromages préparés avec la présure. Cet auteur a noté que les caractéristiques de la pepsine de poulet obtenue étaient analogues à celles de la présure traditionnelle.

Les viscères de poissons sont connus pour être une source riche en enzymes digestives (Reece, 1988). Chez les poissons, l'équipement en enzymes digestives est relativement voisin de celui que l'on connaît chez les vertébrés supérieurs. Ces enzymes sont sécrétées par le pancréas et de façon minoritaire, par l'estomac, sous forme de granule de zymogènes ou proenzymes inactives mêlées à un suc digestif de composition ionique et de pH particuliers (Guillaume, 1999).

Partie bibliographique Généralités sur le lait et la coagulation

Une autre étude a permis l'obtention de la pepsine à partir de l'estomac de divers poissons, notamment le mérou, merlan et le limon ; **Nouani et al. (2002)** ont étudié la possibilité d'utiliser l'extrait coagulant du merlan dans la fabrication du fromage type Edam, cet extrait a donné un bon résultat. **Maachou (2004)** à étudier la pepsine du limon, les caractéristiques de cette dernière diffèrent très peu de la présure traditionnelle. De même **Ait amer Meziane (2008)** à utiliser la pepsine du limon dans la fabrication du fromage type Edam.

I. Matière première

I.1. Le lait

Le lait employé est un lait en poudre, de qualité moyenne température (low heat) à 0% de matière grasse. Il est fourni par la laiterie SOUMMAM Taharacht Akbou Béjaïa. La poudre de lait était conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité durant toute la période expérimentale.

I.2. La présure

L'extrait enzymatique de présure utilisé dans la présente étude est préparé à partir d'une poudre d'enzyme lyophilisée 100% Chymosine. Cette poudre est utilisée dans la laiterie SOUMMAM pour la fabrication du fromage. La solution présure est préparée en additionnant 1.05g de poudre présure à 7.95ml d'eau distillée stérile. Pour activer cette préparation enzymatique, 1g de NaCl est ajouté.

I.3. Matériel animal

Deux sources de matières premières ont fait l'objet de notre étude pour l'obtention d'extraits coagulants ; les proventricules provenant du système digestif du poulet (*Gallus gallus*) et la muqueuse stomacale ou l'estomac du système digestif du Chinchard (*Trachurus trachurus*) communément appelée Chinchard commun ou Saurel.

Le choix que peut présenter ces deux matières premières avicole et marine tient compte de la production nationale en viande blanche qui connaît une évolution considérable représentée essentiellement par celle du poulet de chair, qui représente 99,03 % du total. (MADR 2017). Le Chinchard qui est très commun dans toute la méditerranée comme l'Algérie et la Tunisie (Fezzani S et al ,2006) classé deuxième dans les captures en 2000 (275.000t,>10% des captures totales) (FAO, 2000) ainsi, la possibilité de procurer facilement des quantités suffisantes de ces tissus pour isoler les protéases notamment la pepsine, donc leur emploi comme substitut de la présure contribuera à la valorisation de ces coproduits d'abattage.

I.3.1. Les proventricules de poulet

Un lot d'environ 1 kg de proventricules est récupéré de l'abattoir La Vallée sis à Tignathine (7 Km de Tazmalt Béjaïa), les proventricules sont extraits du tube digestif de poulets âgés de 40 à 45 jours. Acheminés au laboratoire dans une glacière, les proventricules sont ouverts à l'aide d'un couteau et rincés à l'eau courante pour éliminer les particules d'aliment adhérentes puis égouttés et conservés à - 20°C jusqu'à utilisation. La **Figure 4** illustre la forme externe et interne du proventricule.

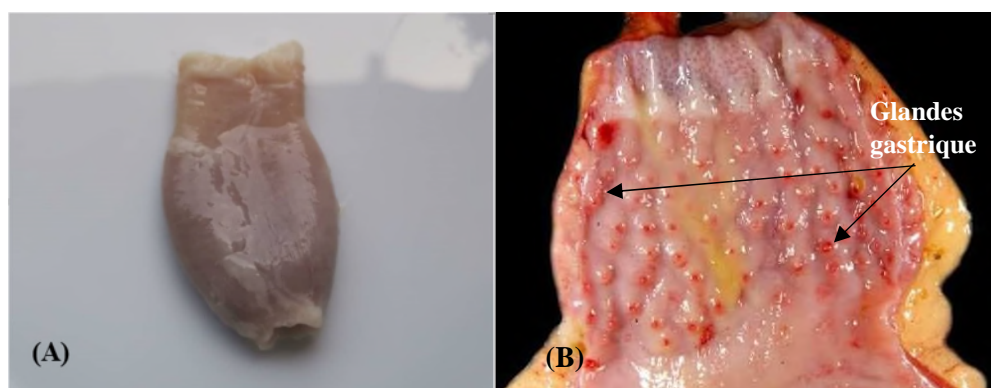


Figure 4 : photographie de pro-ventricules du poulet

A : avant incision

B : après incision

I.3.2. Les viscères de poisson

Un total d'environ 50 viscères a été récupéré de la Poissonnerie Méditerranéenne à Iheddaden Béjaïa, les estomacs (voir **Figure 5**) sont séparés du système digestif par incision, débarrassés de leur contenu, rincés à l'eau distillée puis avec une solution de NaCl à 5%, et de nouveau à l'eau distillée, les estomacs sont égouttés et conservés au congélateur à la température de -20°C jusqu'à utilisation.

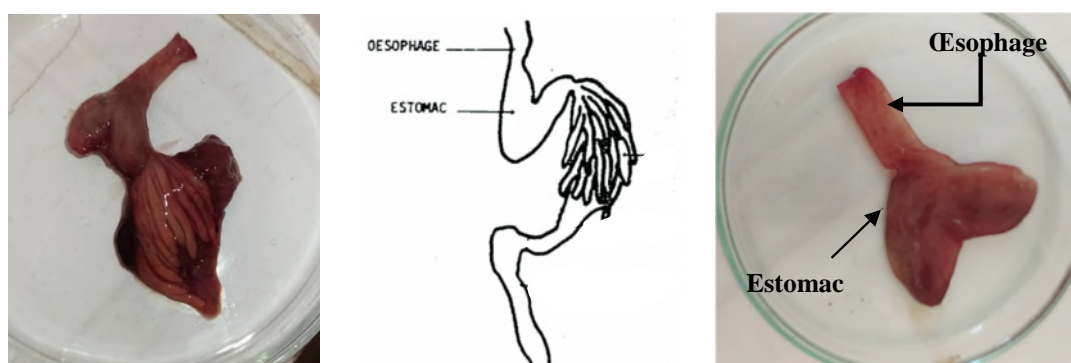


Figure 5 : photographie et schéma du système digestif et de l'estomac du poisson

I. Procédés d'extraction de la pepsine

II.1. Pepsine avicole

L'extraction de la pepsine de poulet est effectuée selon le diagramme décrit par **Bohak (1970)**, les proventricules sont broyés à l'aide d'un appareil (type ménager), ensuite macérés dans une solution de NaCl et NaHCO_3 . Un rapport de 1/3 (masse de la matière/volume de la solution d'extraction) est pris en considération (**Valles et Furet, 1977**). Le macérat est filtré à

travers une gaze, la solution récupérée est centrifugée, le surnageant contenant la pepsinogène subit une activation par abaissement du pH jusqu'à 2 pendant 30min puis réajuster à pH6.4. Les différentes étapes d'extraction sont résumées dans la **Figure 6**.

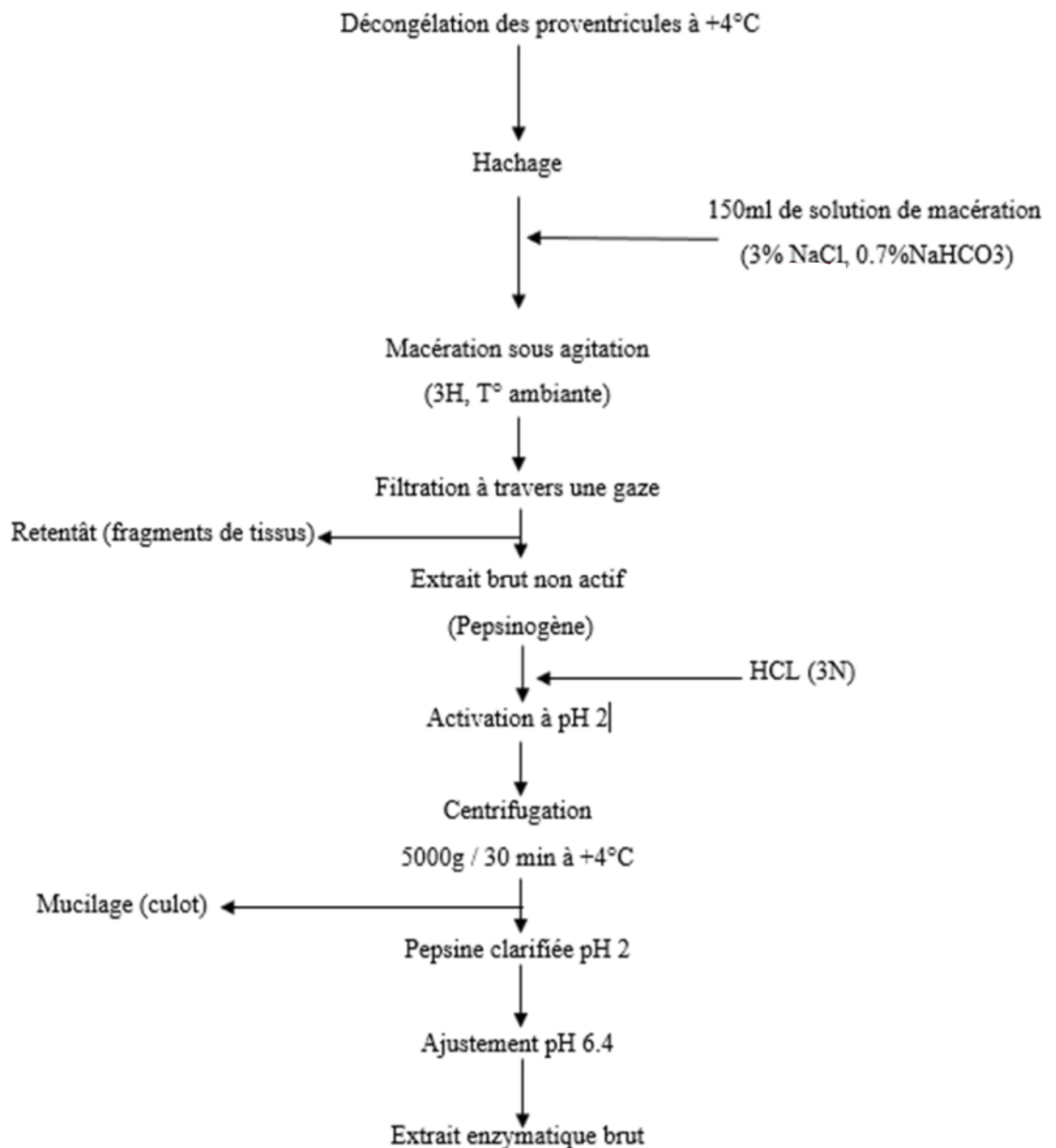


Figure 6 : diagramme d'extraction de la pepsine de poulet (**Bohak,1970**)

II.2. Pepsine Chinchard

La pepsine de chinchard utilisée a été extraite par la méthode adoptée par **Maachou, (2004)**. Les estomacs sont broyés dans une solution d'acétate de sodium 1M pH5 (dans un rapport 1/3), puis soumis à une macération pendant 3heures, puis filtrer à travers une gaze, l'extrait obtenu est centrifugé. Le surnageant contenant le zymogène sera activé à pH 2

pendant 30min en pepsine, puis ajusté à pH 5 pour stabiliser l'enzyme. Les différentes étapes sont résumées dans la **figure 7**.

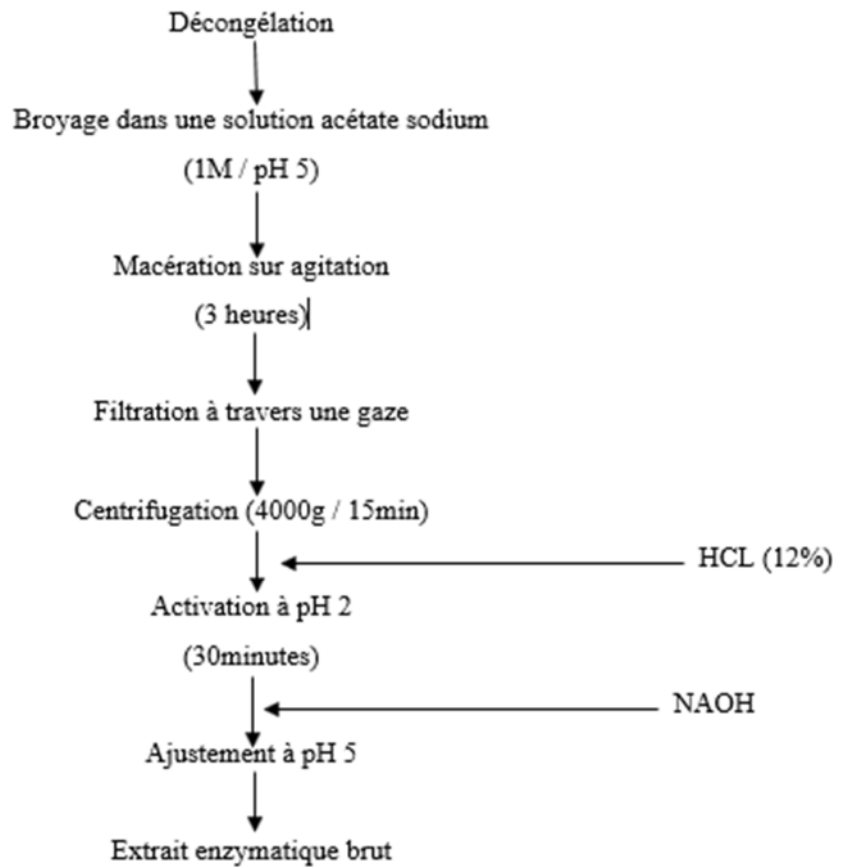


Figure 7 : diagramme d'extraction de la pepsine du Chincharid (Maachou, 2004)

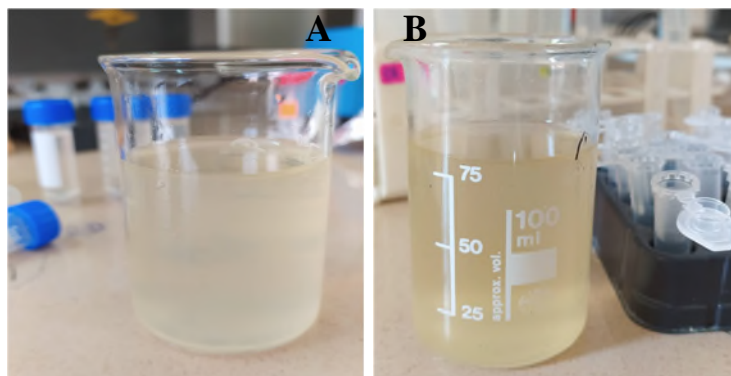


Figure 8 : photographie des extraits bruts étudiés

A : extrait pepsinique de poisson B : extrait pepsinique de poulet

III. Caractérisation physico-chimique des extraits enzymatiques bruts

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

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

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

III.1. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques

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

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

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

Pour 500 µl de chaque extrait enzymatique, 2 ml de réactif de Bradford sont ajoutés. Une fois bien homogénéisé au vortex, l'ensemble est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 20 minutes, et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 595 nm. La concentration en protéines, des extraits enzymatiques, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage avec la protéine du sérum albumine bovine (SAB) réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons (**Annexe III**).

III.2. Mesure des activités enzymatiques

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

III.2.1. Détermination de l'activité protéolytique

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

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

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

Le mélange réactionnel consiste à mélanger 1g de caséine dans 50 ml de tampon phosphate (0.1M, pH 7). Un volume de 1ml de ce mélange est additionné de 1 ml d'extrait enzymatique, qui sera ensuite bien agité et incubé au bain marie à la température de 35 °C pendant 20 minutes, et la réaction est arrêtée par l'addition de 5 ml de TCA à 5% et laissée au repos pendant 15 minutes à température ambiante. L'ensemble est alors centrifugé pendant 15 minutes à 1500 tours.

Ensuite 0.5 ml du surnageant est additionné de 2,5 ml de la solution C préparée en mélangeant un volume de 10 ml de la solution (A) avec un volume de 2 ml de la solution (B).

La solution (A) est préparée en mélangeant 0.2 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 1 g de carbonate de sodium (Na₂CO₃) dans 50 ml d'eau distillée.

La solution (B) est préparée en mélangeant 0.1 g de tartrate sodium-potassium (C₄H₄KNaO₆) et 50mg de sulfate de cuivre (CuSO₄) dans 10 ml d'eau distillée.

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

Une fois bien agité, une incubation est demandée pendant 20 min à une température de 35°C, une coloration bleue apparaît, 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. Et à partir de la solution mère préparée en mélangeant 25 mg de la tyrosine avec 25ml du tampon phosphate, 400µl de cette dernière (solution mère) est

additionnée par 3600 μ l du tampon phosphate pour avoir au final une solution tyrosine diluée 1/10.

L'activité protéolytique, exprimée en μ g/h.ml, correspond à la libération de 1 μ 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.

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

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

$$\text{Activité spécifique} = \text{activité enzymatique } (\mu\text{g /ml.min}) / \text{teneur en protéines (mg/ml)}. (2)$$

III.2.2. Mesure de l'Activité coagulante

L'activité coagulante qui est exprimée par la rapidité avec laquelle l'enzyme coagule le lait, est déterminé selon la méthode de **Berridge (1955)** et **Libouga et al. (2006)**.

- **Préparation du substrat de Berridge**

Le substrat de Berridge est préparé par la dissolution de 120mg de poudre de lait de type low-heat dans 100ml de chlorure de calcium [CaCl₂ (111mg)] la solution est soumise sous agitation pendant 30minutes. Le pH est ensuite ajusté à 6.4, le lait écrémé ainsi reconstitué est appelée « substrat de Berridge ».

- **Détermination de l'activité coagulante :**

Introduire Dans des tubes à essai 5ml de substrat de Berridge puis placée dans un bain marie à une température de 35°C pendant environ 5min, donc le temps de floculation est l'intervalle de temps compris entre l'addition de l'extrait enzymatique jusqu'à l'apparition de fins flocons au niveau du tube à essai.

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

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

Avec :

- U.P** = unité présure ;
- V** = volume de lait (substrat de Berridge) ;
- 10** = volume du substrat standard (10 ml) ;
- 100** = temps de coagulation du substrat standard (100 secondes) ;
- v** = volume de l'extrait d'enzyme;
- t** = temps de floculation en seconde.

L'activité coagulante peut être également exprimée par la force coagulante (**F**), donnée en unité Soxhlet (US). Elle représente le nombre de volumes de lait frais coagulé par un volume d'extrait coagulant, pendant un temps de 40min à 35°C (**Alais, 1984 ; Schuck et al., 2000 ; Benyahia-Krid et al., 2010**). La force coagulante (**F**) est calculée selon la formule suivant :

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

Avec :

- V**: volume de lait.
- v** : volume de l'extrait enzymatique.
- T** : temps de coagulation en secondes.
- 2400**: temps d'incubation [(40min) x 60 secondes].

IV. Etude des paramètres influençant l'activité enzymatique

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

L'influence de la température sur l'activité coagulante est étudiée en mesurant l'activité coagulante des extraits bruts étudiés à différentes températures en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique.

La détermination de la température optimale de coagulation a été obtenue par la variation de température du mélange réactionnel qui sont : 35°C 40°C 45°C 50°C 55°C 60°C 65°C 70°C 75°C 80°C avec un pas de 5.

Le choix de ces températures est justifié par le fait que la coagulation du lait en fromagerie s'effectue à des températures supérieures à 30°C. (**Ramet 1985**)

IV.2. Effet du potentiel hydrogène (pH) sur l'activité coagulante :

L'influence du pH du lait (substrat de Berridge) sur l'activité coagulante des extraits pepsiniques et la présure a été étudiée en faisant varier le pH du substrat de 6 à 8, avec un pas de 0.5, l'ajustement du pH se fait par l'addition des solutions (HCl 0.01N) ou (NaOH 0.01N).

La température du substrat est ramenée à 45°C afin de mesurer le temps de coagulation, qui est le temps écoulant entre l'addition de 500µl d'extrait enzymatique à 5ml du substrat de Berridge se manifestant par des premiers flocons visibles à l'œil nu.

Le choix de cet intervalle de valeurs de pH est basé sur le fait qu'à des valeurs inférieures à 5.8 la coagulation peut devenir acide et l'augmentation du pH une valeur supérieure à 8 peut provoquer l'inactivation de la protéase employée.

IV.3. Effet de la concentration de chlorure de calcium (CaCl₂) sur l'activité coagulante

L'influence de la concentration de CaCl₂ sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés est réalisée à 45°C à pH de 6.4, en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique, préparés avec des différentes concentrations du lait en ions de CaCl₂ : 0.005M, 0.01M, 0.02M, 0.03M, 0.04M, 0.05M.

IV.4. Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante

L'influence de concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante est réalisée par l'ajout de l'extrait au substrat de Berridge préparé, à une température de 35°C et cet effet a été déterminé en faisant varier leurs concentrations de 250µL, 750µL, 1000µL, 1250µL, 1500µL.

Afin de compléter l'étude comparative entre les deux extraits enzymatiques avec la présure, une comparaison entre les fromages élaborés en utilisant respectivement l'extrait de poulet, l'extrait du chinchard et la présure est jugée nécessaire.

V. Elaboration d'un fromage frais par les extrais étudiés et par la présure

Un fromage frais est préparé, en suivant les étapes du processus de (Luquet, 1987), le lait utilisé est un lait cru de vache récupéré chez un fermier dans le village de Tinebdar à Sidi Aich, transporter au laboratoire dans un glacière, le lait est pasteurisé à 90°C.

A la fin de cette opération, Le lait est réparti dans trois bécchers stériles, on plonge les récipients dans un bain de glace, jusqu'à température optimale d'ensemencement pour chaque extrait enzymatique.

Le lait destiné pour l'ensemencement avec l'extrait du poulet et du poisson est refroidi jusqu'à température de 60°C, et celuiensemencé avec l'extrait de présure est refroidi jusqu'à 40°C.

L'ensemencement de chaque lait, est réalisé, avec un volume de 500 µl/L d'extrait de poulet, 500 µl/L d'extrait de poisson et 100 µl/L de solution de présure, respectivement. La coagulation a été réalisée dans une étuve thermostatée à 45°C pendant 12h environs, jusqu'à l'obtention du caillé, qui sera découpé à l'aide d'un couteau, et transvasé sur une toile pour l'égouttage. Cette opération, est améliorée par une pression à la main de la toile. Les caillés bien égouttés sont répartis dans des récipients de conservation, additionnés d'NaCl.

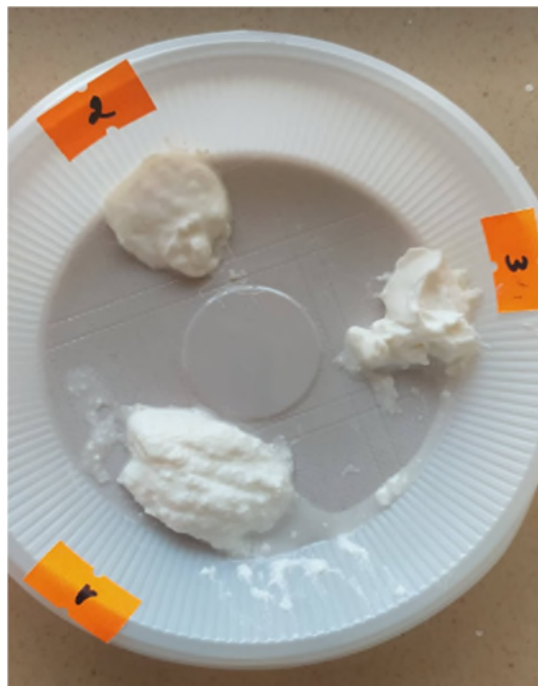


Figure 9 : photographie des échantillons de fromages frais obtenus

Echantillon 1 : Présure ; Echantillon 2 : Pepsine du Poulet ; Echantillon 3 : Pepsine du Chinchard

VI. Analyse sensorielle des fromages

La réalisation de l'analyse sensorielle a pour but de comparer entre les fromages, dont le premier issu de la coagulation par la pepsine du poulet, le second par la pepsine du chinchard et le troisième issu de la coagulation par la présure, ainsi que d'estimer le degré d'acceptabilité du

nouveau produit par les dégustateurs. L'évaluation sensorielle des produits expérimentaux est réalisée au niveau du laboratoire technologie alimentaire, de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, et ceci en présence d'un jury de dégustateurs dont la majorité d'âge de 20 à 35 ans, Une présentation de 3 échantillons de fromage de portion de (5g) est exposé de façon anonyme aux dégustateurs. Un questionnaire (**AnnexeV**) portant des critères bien établis est présenté.

I. Caractéristiques des extraits enzymatiques étudiés

Afin de comparer le pouvoir coagulant des deux extraits bruts étudiés, une prise d'essai équivalente à 50g a été utilisée pour effectuer une extraction. Une fois cette opération est réalisée, deux extraits d'origine animale ont été récupérés et sont nommés E1 et E2 désignant respectivement l'extrait enzymatique brut de pro-ventricules de poulet et de la muqueuse stomacale du chinchard.

Un extrait enzymatique de la présure a été également étudié afin de mieux comparer l'aptitude de ces deux extraits a remplacé l'extrait enzymatique industriel.

Les résultats de la caractérisation de ces deux extraits obtenus et de l'extrait industriel (présure) sont représentés dans le **tableau II**.

Tableau II : Résultats de la caractéristique physicochimique des extraits enzymatiques étudiés.

Paramètre	E1	E2	Présure
pH	6.4	5	4.5
Couleur	Jaunâtre	Blanchâtre	Transparente
Texture	Liquide	Liquide	Liquide
Rendement (%)	86.66	53.33	/

L'extrait pepsine de poulet obtenu est une solution de couleur jaune clair avec une odeur moyennement prononcée et présente un aspect liquide à pH de l'ordre de 6.4, tandis que l'extrait enzymatique du poisson est une solution de couleur très clair avec un aspect liquide et une odeur peu prononcée dont sa valeur du pH égale à 5.

Les résultats obtenus dans la présente étude, concernant les caractéristiques physicochimiques, confirment ceux publiés par **Nouani et al. (2009)** et **Hamrani (2008)** lors de leurs travaux sur les pepsines de poulet et de poisson.

Selon **Bohak (1970)** et **Adoui (2007)** les extraits pepsiniques du poulet possèdent une couleur jaunâtre.

Le volume moyen de l'extrait enzymatique obtenu à partir de 50 g de proventricules de poulet est d'environ 130 ml, ce qui lui confère un rendement d'extraction moyen de 86,66%. Ce rendement est proche à celui indiqué par **Siar (2014)** (soit de 84,43 %). Le volume de l'extrait obtenu à partir de 50g d'estomacs de poisson est d'environ 80ml, c'est-à-dire un rendement d'extraction de 53.33%.

I.1. Dosage des protéines de l'extrait enzymatique

Les résultats obtenus de dosage de taux de protéines dans les extraits étudiés est déterminé en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec la BSA dans les mêmes conditions opératoires (**AnnexeIII**) sont représentés dans la **figure 10**.

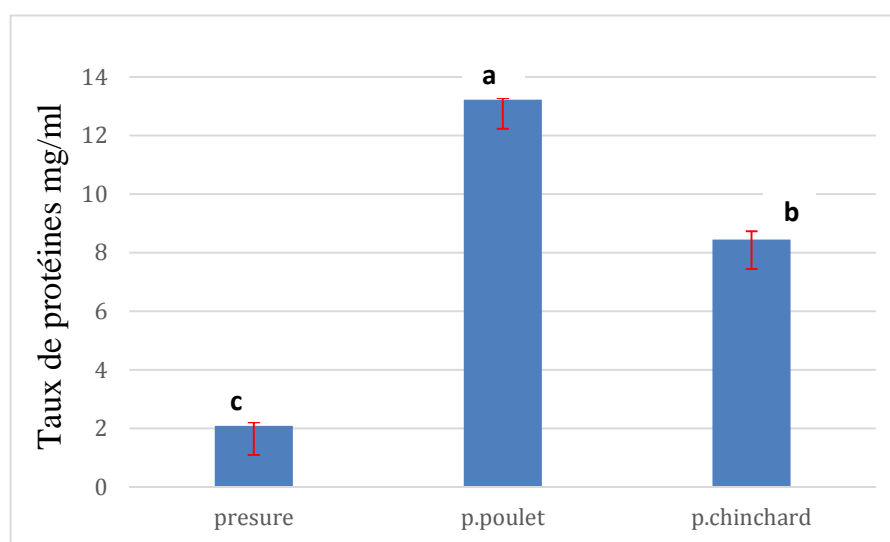


Figure 10 : Taux de protéines des extraits enzymatiques étudiés.

Les lettres a,b,c représentent la différence significative ($p \leq 0.05$)

D'après les résultats obtenus dans la présente étude la teneur en protéines la plus élevée est retrouvée dans l'extrait enzymatique (pepsine) du poulet avec une valeur de 13.23 mg/ml suivi par l'extrait du chinchard (8.45 mg/ml). Le taux de protéines retrouvé dans l'extrait de présure est le plus faible avec une moyenne de 2.09 mg/ml.

Les résultats obtenus sont légèrement différents de ceux rapportés par la bibliographie.

Azzouzi et Yaghla (2020) et **Ait amer meziane (2008)** ont retrouvés des taux en protéines de l'extrait brut de pro-ventricules du poulet estimé à 8.77 mg/ml et 11.06 mg/ml, respectivement. Tandis que **Siar (2014)** et **Benyahia (2013)** ont publiés des taux de l'ordre de 20.10 et 35.40 mg/ml, respectivement.

De même **Nouani et al. (2011)** dans leur étude sur les succédanés de la présure, ont retrouvés un taux de protéines de l'extrait enzymatique du poulet qui oscille à 147.3 mg/ml.

La teneur en protéines rapporté par **Nouani (2009)** et **Hamrani (2008)** pour le poisson type limon est de 35 mg/ml. Par ailleurs, **Ait amer meziane (2008)** a retrouvé une valeur de 5.93 mg/ml pour le limon.

Plusieurs facteurs peuvent modifier le taux de protéines dans un extrait donnée entre autres les pertes au cours de différentes opérations d'extraction ainsi que la filtration qui sépare les déchets solides mais retiens une partie relativement importante des protéines (Morsli, 1997).

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 protéases. Les résultats obtenus de l'estimation de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques étudiés sont représentés dans la figure suivante :

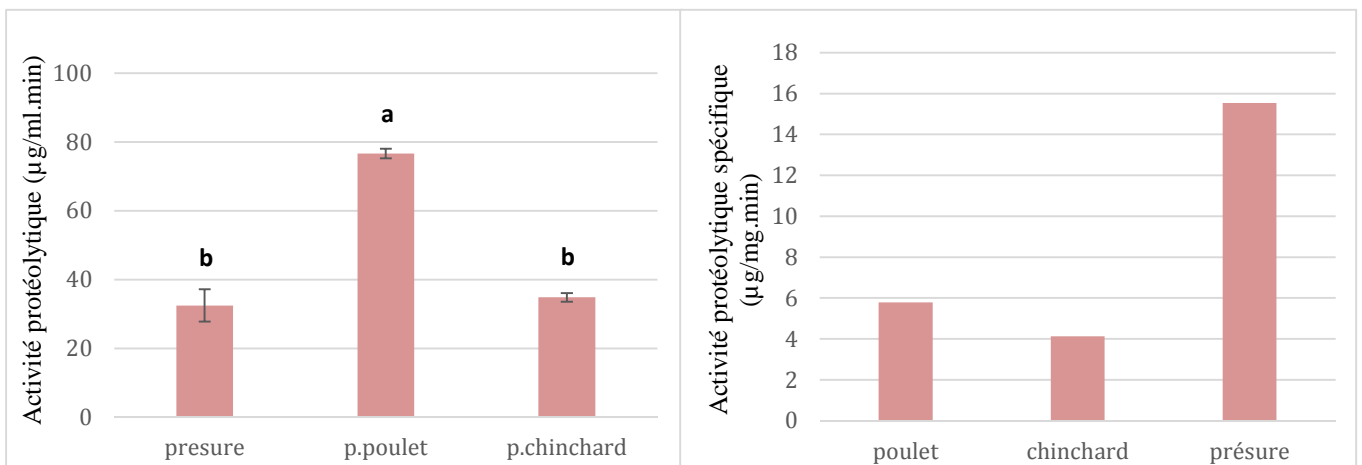


Figure 11 : Activité protéolytique et protéolytique spécifique des extraits enzymatiques étudiés.

Les lettres a,b représentent la différence significative ($p \leq 0.05$)

D'après les résultats obtenus, l'activité protéolytique, exprimée par le taux de tyrosine libéré, de l'extrait (pepsine) de pro-ventricules du poulet est de 76.64 µg/ml.min, plus élevée que celle de l'extrait du poisson chincharde (34.86 µg/ml.min) et de l'extrait industriel de la présure (32.49 µg/ml.min). Ce résultat est confirmé par plusieurs auteurs qui ont signalé une activité protéolytique de la pepsine supérieure à celle de la présure.

Siar (2014) a rapporté une teneur de 117 µg/ml.min soit une activité protéolytique trois fois plus élevée que l'extrait de la présure.

Plusieurs travaux de recherches ont signalé que l'activité protéolytique de la pepsine de poulet est plus élevée que celle de la présure (**Bohak, 1969 ; Stanley et al., 1980 ; Findlay et al., 1984**).

Par contre **Gordin et Rosenthal (1978)**, **Adoui (2007)** et **Boughellout, (2007)** ont retrouvés des activités protéolytiques de la pepsine inférieures aux activités de la présure.

Par ailleurs, une faible activité pourrait être expliquée par une activité protéolytique limitée et spécifique, pendant la première phase de dégradation correspondant à la phase enzymatique, la caséine κ est clivée spécifiquement au niveau de la liaison 105-106 (Phe-Met), alors que l' α et la β caséines ne sont pas affectées (**Alais, 1984**). Cette sélectivité et spécificité de la présure pour son substrat, la caséine κ fait d'elle l'enzyme par excellence utilisée en fromagerie (**Danley et al., 1988**).

L'activité protéolytique spécifique élevée de la présure est due à sa pureté élevée (100% chymosine), contrairement à l'extrait de la pepsine de poulet et du poisson qui contiennent des protéines enzymatiques autre que la pepsine et des protéines non enzymatiques.

L'activité protéolytique de l'extrait de poisson (chinchard) de la présente étude est très proche à celle de la présure étudiée. Cette pepsine du poisson pourrait donc être envisageable à l'utilisation en production fromagère.

I.3. Activité coagulante

Les résultats obtenus de l'estimation de l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés sont représentés dans la figure suivante :

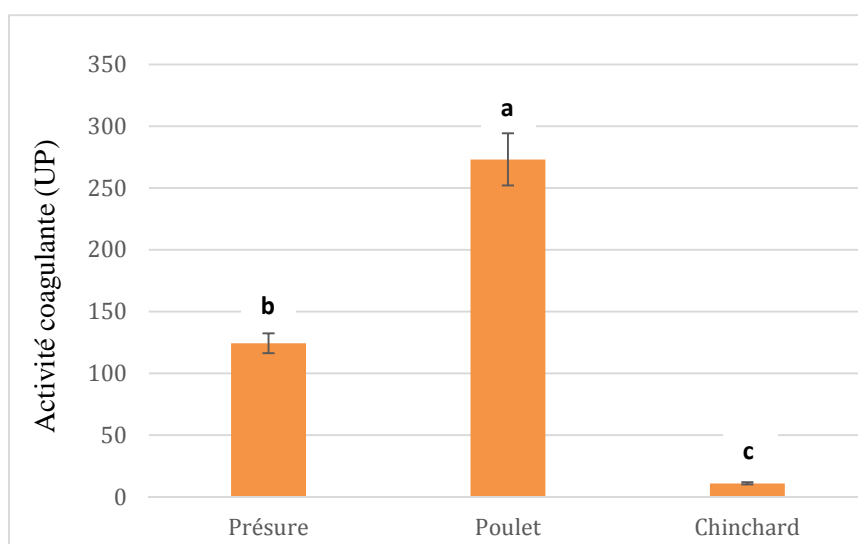


Figure 12 : Activité coagulante des extraits étudiés.

Les lettres a,b,c représentent la différence significative ($p \leq 0.05$)

Les résultats obtenus montrent que l'extrait de poulet possède une activité coagulante de l'ordre de 273.2 UP/ml deux fois plus supérieure à celle de l'extrait enzymatique industriel de la présure (124.34 UP/ml).

Des valeurs différentes ont été rapportés par plusieurs autres auteurs, en effet des activités estimées à 15,08 UP/ml, 13,33 UP/ml et de 18,61 UP/ml ont été retrouvés par **Adoui (2007)**, **Nouani (2011)** et **Siar (2014)** respectivement. De même, **Benyahia (2013)**, **Boughellout (2007)** et **Paez de leon et al., (1995)** ont rapportés des activités de l'ordre de 60 UP/ml, 2,42 UP/ml, et 5,52 UP/ml, respectivement.

Les résultats obtenus de la présente étude montrent que l'extrait enzymatique brut du poisson (chinchard) présente une activité coagulante de l'ordre de 10.99 UP/ml, largement plus importante que celle de l'extrait enzymatique du poisson (limon) retrouvé par **Hamrani (2008)** estimé à 2.27 UP/ml.

La différence de l'activité coagulante peut être due soit au pH d'emprésurage qui influence directement l'activité coagulante des enzymes, ou également au temps de floculation, qui diminue lorsque le pH est abaissé au-dessous de sa valeur ordinaire dans le lait. Toutes les enzymes coagulantes de fromagerie sont des protéases à caractère acide. De ce fait, leur activité est généralement optimale aux valeurs proches de 5,5 (**Ramet, 1997**).

En termes de force coagulante l'extrait de la pepsine de la présente étude possède une force de l'ordre de **1/1714,28**. Ce résultat est inférieur à celui obtenu par **Nouani et al. (2011)** évalué à 1/3200 et par **Adoui (2007)** estimé à 1/2579.

La force coagulante de l'extrait du chinchard est d'environ 1/631,57 très proche à celle rapportée par **Souaré et al. (2017)** qui est de 1/856,57.

Selon **Maachou (2004)** l'activité de l'extrait du poisson (limon) est de l'ordre de 1/1200, tandis que **Nouani et al. (2011)** a publié que l'activité de l'extrait du poisson (lotte) est de 1/500.

II. Détermination des conditions optimales de coagulation des extraits enzymatiques étudiés

II.1. Effet de la température sur l'activité coagulante

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**).

De ce fait, une étude de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatique étudiés a été réalisée. La variation de l'activité des extraits enzymatiques est suivie en fonction de la température de 40°C à 80°C. Les résultats obtenus de cette influence sont représentés dans la figure suivante :

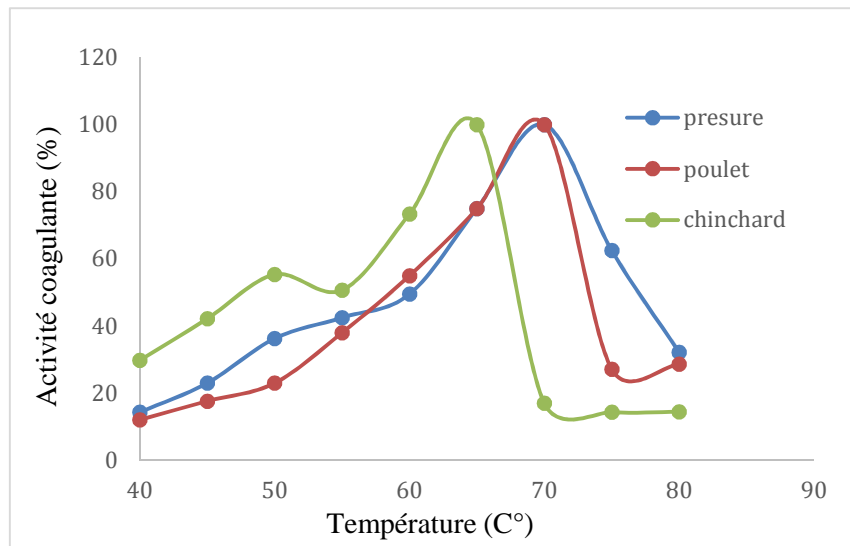


Figure13 : L'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

Les résultats de la présente étude montrent que l'activité enzymatique des trois extraits est très influencée par la température, et cette activité augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à une certaine valeur puis elle décroît.

L'activité coagulante de l'extrait de poulet ainsi que celui de la présure atteint la valeur maximale à la température de 70°C. Par contre, l'extrait de poisson son activité maximale est observée à la température de 65°C, puis diminue au-delà de 70°C.

En effet, la coagulation du lait ne peut avoir lieu qu'à des températures supérieures ou égales à 18°C, ce qu'est due à l'importance des interactions hydrophobes dans l'agrégation des micelles hydrolysées (**Horne and Banks, 2004**).

D'après des auteurs, lorsque la température du milieu augmente les particules (molécules ou ions) sont plus agitées, ce qui favorise la rencontre des différents réactifs. Les molécules s'entrechoquent et libèrent de l'énergie, qui permet ensuite d'atteindre plus rapidement le palier de l'énergie d'activation nécessaire à la réaction. Dans ce cas, l'augmentation de la température a un effet positif sur la réaction, mais après une certaine activité thermique, elle diminue en raison de la dénaturation (**Özer et al. 2010; Kumar et al. 2012 ; Bayraktar et Önal, 2013**).

Robitaille et al., (2012) ont mentionnés aussi que 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.

Selon **Lucey (2002)**, la température optimale pour la coagulation du lait par la présure est au voisinage de 45°C, pour un lait à pH=6.6, cela est confirmé aussi par **Garnot et Martin**

(1980) qu'ont indiqué que la présure présente une activité coagulante optimale au voisinage de 40°C.

Par ailleurs, **Morsli et al. (1996)** et **hamrani (2008)** ont rapporté que la température optimale de l'activité de la pepsine du poulet est de 40°C.

Pour la pepsine purifiée de poisson (limon), les travaux de **Maachou (2004)** et de **slamani (2004)** ont indiqué que la température optimale d'activité coagulante est de 55°C.

II.2. Effet du pH sur l'activité coagulante

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 6-7 (pH neutre), et 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 potentiel d'hydrogène (pH) sur l'activité coagulante des extraits pepsiniques (poulet et poisson) et de l'extrait (présure) a été étudié en ajustant le pH de lait (substrat de Berridge) aux valeurs de l'intervalle 6 à 8, en fixant la concentration de CaCl_2 et la température d'incubation aux valeurs de 0.01M et 35 °C, respectivement.

Les résultats obtenus, de l'évaluation de l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés en fonction du pH du lait, sont représentés dans la figure suivante :

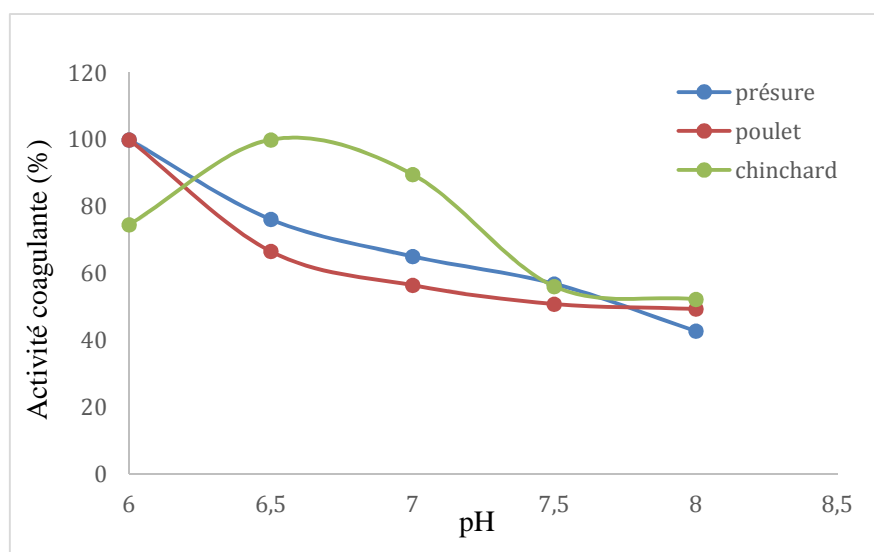


Figure 14 : L'effet du pH sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

Les résultats obtenus montrent que l'activité coagulante maximale est atteinte à la valeur du pH égale à 6 pour les extraits de présure et de la pepsine du poulet, tandis que pour l'extrait pepsiniques du poisson (chinchard), elle est atteinte au pH des alentours de 6.5.

Les résultats de la présente étude indiquent que l'activité coagulante des extraits de présure et de la pepsine du poulet diminue au fur et à mesure de l'augmentation du pH du milieu réactionnel. Les résultats obtenus montrent également que l'activité coagulante de l'extrait pepsiniques du poisson (chinchard) augmente progressivement avec l'augmentation du pH jusqu'à la valeur de 6.5 puis elle diminue jusqu'à la valeur du potentiel d'hydrogène aux alentours de 7.5 où elle commence à se stabiliser.

Green et al. (1984) ont indiqué que lorsque le pH du lait est abaissé à 6,5 l'activité coagulante de l'extrait pepsiniques subi une double augmentation. Alors que **Nouani et al. (2009)** et **Benyahia (2013)** ont mentionnée que la pepsine de poulet possède une activité coagulante maximale à la valeur du pH égale à 5.

Selon **Garnot et Martin (1980)** l'activité coagulante optimale de la présure bovine est atteinte à la valeur de pH égale à 5,8. Par ailleurs, **D'Ambrosio et al. (2003)** ont indiqué que la pepsine purifiée du poisson a une activité optimale enregistrée aux valeurs de pH de 6,5 et 7,5.

D'après les résultats de la présente étude, le pH joue un rôle très important dans la coagulation du lait et son influence sur l'activité coagulante des enzymes est dépendante de leur origine.

II.3. Effet de la concentration de CaCl_2 sur l'activité coagulante :

L'addition du chlorure de calcium au lait, réduit son pH, qui résulte de l'augmentation du taux d'agrégation des protéines (**Flüeler and Puhan, 1978 ; Gastaldi et al., 1994**).

L'effet de la concentration du CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante des extraits brut de pepsine de poulet, poisson et la présure a été étudié en variant la concentration en CaCl_2 du lait (substrat de Berridge) aux valeurs : 0.005M ; 0.01M ; 0.02M ; 0.03M ; 0.04M et 0.05M. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure suivante :

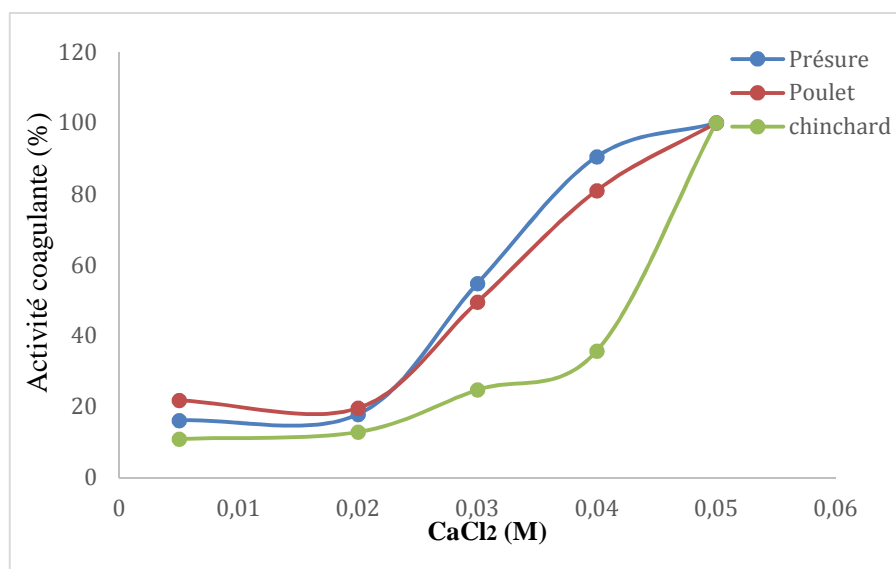


Figure15 : L'effet du CaCl₂ sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

Les résultats de la présente étude montrent que l'activité coagulante des extraits étudiés augmente avec l'augmentation de la concentration de chlorure de calcium jusqu'à atteindre la valeur maximale au voisinage de la concentration de 0,05M.

Ce résultat est en accord avec ceux publiés par plusieurs auteurs (**Storry et al., 1983 ; Tervalta et al., 1986 ; Moutilla et al., 1995 ; Balcones et al., 1996**). En effet, ces derniers rapportent que l'addition de Ca²⁺, réduit le temps de la coagulation du lait, mais à des concentrations en CaCl₂ supérieures ou égales à 0,3M et au-delà le temps de coagulation peut augmenter (**McMahon et al., 1984 ; Patel and Reuter, 1986**).

Selon **Cheftel et al., (1977)** à des concentrations élevées en CaCl₂, l'activité coagulante baisse par un effet inhibiteur de l'ion calcium.

D'après **Garnot et Martin (1980)**, l'optimum d'activité de la présure d'origine animale est obtenu à la concentration en CaCl₂ de l'ordre de 0,02 M, tandis que pour la pepsine de poisson elle est atteinte à la concentration entre 0,05M et 0,06 M (**Maachou, 2004 ; Slamani, 2004**).

II.4. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité coagulante

L'effet de la concentration des extraits enzymatiques étudiés (pepsine de poulet, poisson et la présure) sur l'activité coagulante a été étudiée en variant la concentration de ces extraits aux valeurs de 250μL ; 750μL ; 1000μL ; 1250μL ; 1500μL. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante :

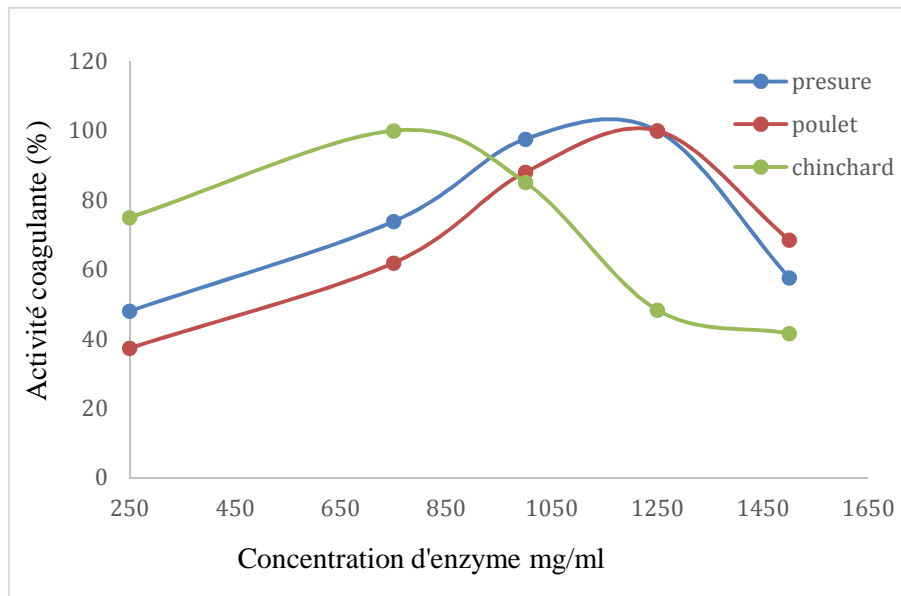


Figure16 : L'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante.

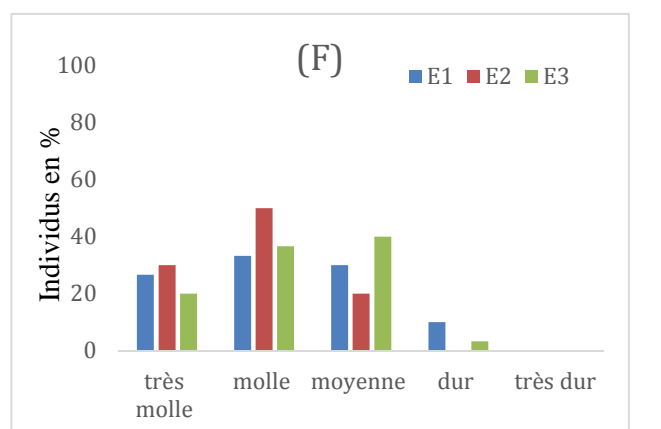
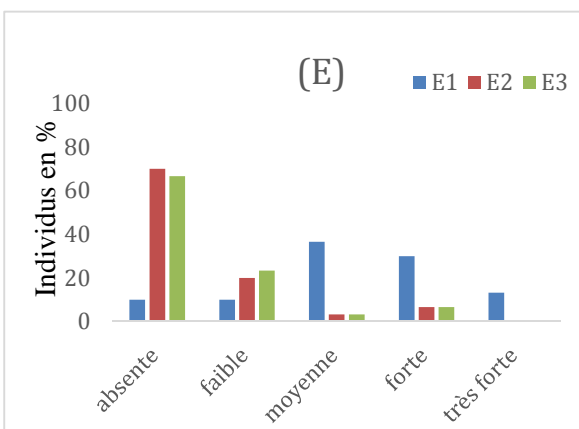
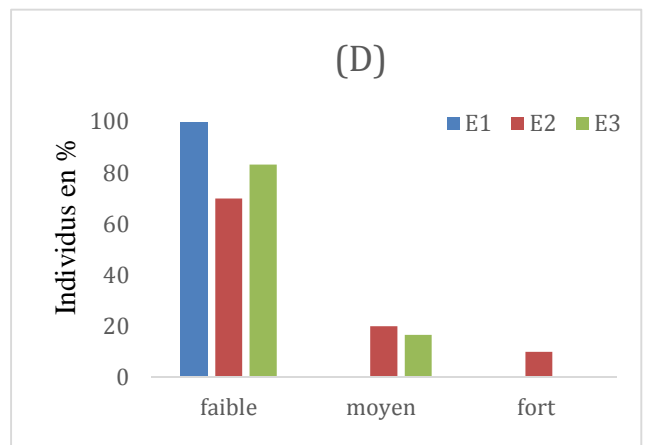
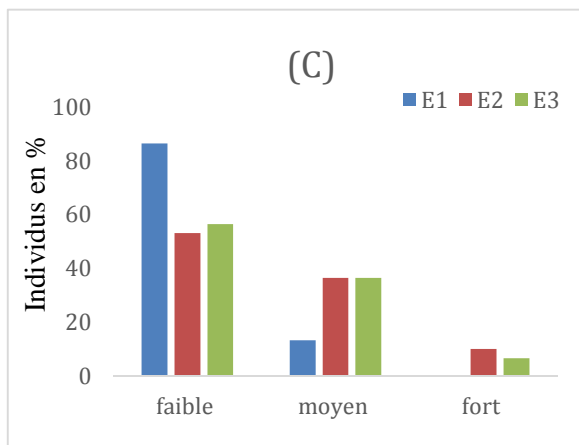
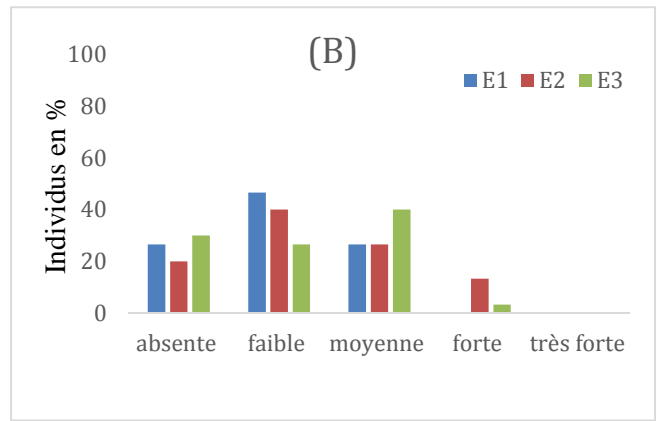
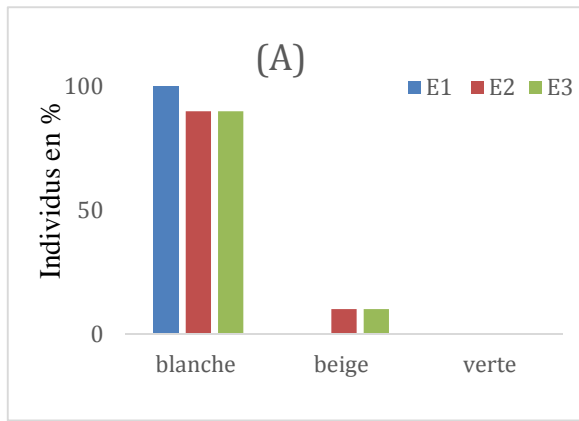
Les résultats obtenus, de l'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante, indiquent une augmentation de l'activité coagulante avec l'augmentation de la concentration en enzyme, jusqu'à une valeur, puis elle diminue progressivement.

L'activité coagulante la plus élevée pour la présure et la pepsine de poulet est atteinte à la concentration de 1250 μ L par contre la pepsine de poisson l'activité coagulante maximale est enregistrée à 750 μ L.

Selon **Ramet et Weber (1980)** la concentration en enzyme dans les limites utilisées en fromagerie influe aussi sur la vitesse de raffermissement du gel. Elle n'a en revanche pas d'effet sur la fermeté.

III. Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle est la technique qui utilise les sens de l'homme pour connaître et décrire les caractéristiques organoleptiques d'un produit. Les résultats de dégustation ainsi que les préférences des trois fromages étudiés, en se basant sur les caractères suivants : Couleur, Odeur, Gout, Texture, Dureté, Tartinabilité sont donnée respectivement dans la figure suivante :



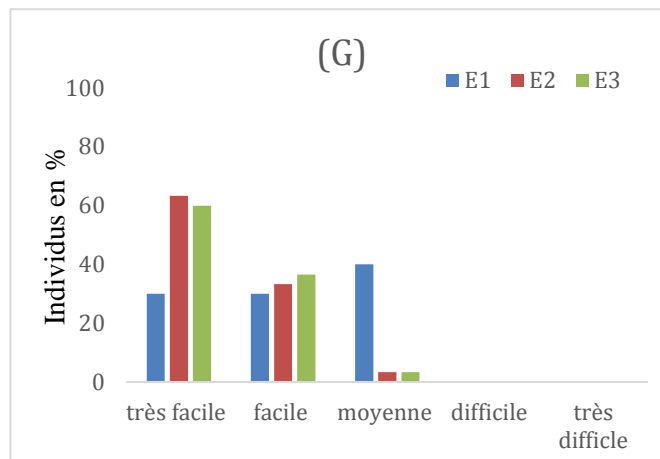


Figure17 : Résultats de l'analyse sensorielle des trois fromages étudiés. (E1 : présure, E2 : extrait de poulet, E3 : extrait de poisson) avec : (A) : couleur, (B) : odeur, (C) : gout acide, (D) : gout amère, (E) : texture granuleuse, (F) : dureté, (G) : tartinabilité.

D'après les résultats obtenus, il est clair que les trois fromages présentent des points communs et des points de différences. La majorité des dégustateurs ont mentionnée que les trois échantillons ont une couleur blanche avec un reflet beige, ceci montre la grande ressemblance vis-à-vis du critère étudié.

Les résultats obtenus, pour le critère d'odorat assurent que l'odeur est faiblement présente pour les trois fromages étudiés même si une odeur légèrement forte est ressentie par certain dégustateurs vis-à-vis du fromage issu de la coagulation par l'extrait de poulet.

La stabilité de gout est présente dans les trois fromages. En effet les deux fromages issus de la coagulation par l'extrait de poulet et l'extrait de poisson sont considérés moyennement acides et amère.

Pour la texture, les fromages élaborés par les extraits de poulet et de poisson, les candidats de dégustation n'ont pas trop appréciés leur texture, qui est probablement due à la nature du caillé obtenue caractérisée par de grains de faible proportion. Par contre, le fromage obtenu par la présure est caractérisé par une pâte fortement granuleuse plus au moins lisse avec une texture plus ferme. En vérité, cette stabilité est due à la faible activité protéolytique que contient la présure ainsi qu'à la spécificité de son action sur les caséines.

Une différence dans la dureté est présente pour les trois fromages en notant que les dégustateurs ont mentionnées que le fromage issu de la coagulation par l'extrait de poulet est molle par contre celui de l'extrait de poisson est moyennement molle, et le fromage issu de la coagulation par la présure est dur par rapport aux autres fromages. Ceci est confirmé par le

critère de tartinabilité des trois fromages d'où les résultats obtenus montrent que le taux de tartinabilité est plus élevé pour les deux fromages issus des extraits de poulet et le poisson contrairement à celui issu de la coagulation par la présure.

D'après les résultats obtenus par les dégustateurs, le fromage obtenu par les deux extraits (poulet et poisson) sont les plus appréciés par rapport à celui de la présure.

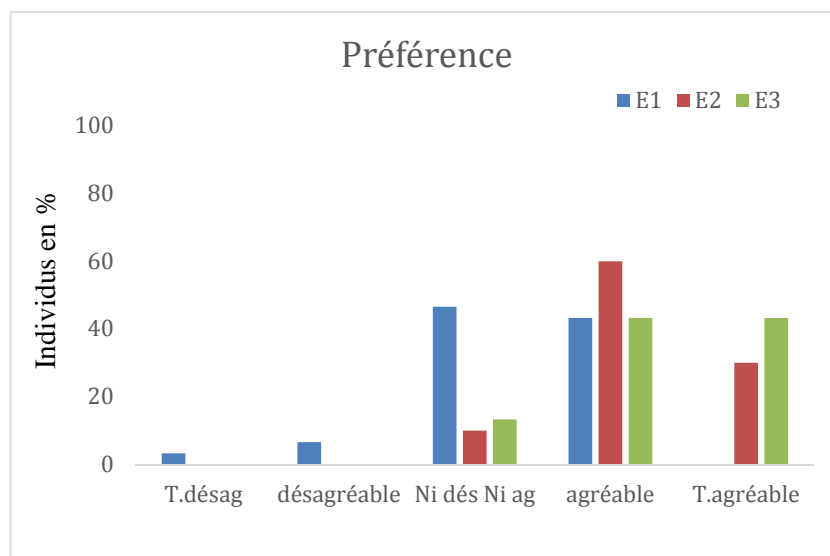


Figure18 : Résultats des préférences des dégustateurs des fromages élaborés (E1 : présure, E2 : extrait de poulet, E3 : extrait de poisson).

Au terme de cette étude sensorielle, il est observé que les deux extraits bruts de poulet et poisson, présentent des avantages qui leurs permettent de remplacer la présure dans la fabrication du fromage frais.

En effet, les paramètres couleur, texture et le gout et à moindre degré l'odeur répondent aux nécessités exigés pour ce type de fromage et sont proche de celui du fromage issu de la coagulation par la présure.

Ce travail visait la caractérisation d'un agent coagulant extrait à partir du système digestif du poisson (estomac) et du poulet (pro-ventricules), et également tester la possibilité de son utilisation dans la fabrication des fromages.

Pour atteindre l'objectif de l'étude, notre démarche a comporté deux étapes. En premier lieu, la récupération des matières premières renfermant le système enzymatique recherché, l'extraction de l'extrait brut et sa caractérisation en déterminant sa teneur en protéines, ses activités coagulantes et protéolytiques, ainsi que l'étude de l'influence des paramètres physico-chimiques du lait (Température, pH et $[CaCl_2]$), et la concentration en extrait enzymatique sur l'activité coagulante.

En second lieu, un fromage frais a été élaboré par coagulation aux extraits bruts étudiés (extrait pepsinique du poulet, extrait pepsinique du chinchard, et à l'extrait présure industrielle) afin de tester la possibilité de leur utilisation comme succédanés de la présure.

Les résultats obtenus de la caractérisation physicochimique et de l'étude des activités enzymatiques des extraits étudiés montrent que :

- L'extrait pepsine du poulet obtenu est une solution liquide de couleur jaune clair avec une odeur moyennement prononcée et un pH de 6.4, tandis que l'extrait enzymatique du poisson est une solution de couleur très claire et une odeur peu prononcée et un pH de 5, l'extrait industriel de présure est une solution transparente avec un aspect liquide et un pH équivalent à 4.5.
- La teneur en protéines la plus élevée est retrouvée dans l'extrait enzymatique (pepsine) de poulet avec une valeur de 13.23 mg/ml suivi par l'extrait du chinchard (8.45 mg/ml). Le taux de protéines retrouvé dans l'extrait de présure est le plus faible avec une moyenne de 2.09 mg/ml.
- L'activité protéolytique, exprimée par le taux de tyrosine libéré, de l'extrait (pepsine) de pro-ventricules de poulet est de 76.64 $\mu\text{g/ml.min}$, plus élevée que celle de l'extrait du poisson chinchard (34.86 $\mu\text{g/ml.min}$) et de l'extrait industriel de la présure (32.49 $\mu\text{g/ml.min}$).
- L'extrait de poulet possède une activité coagulante de l'ordre de 273.2 UP/ml, deux fois plus supérieure à celle de l'extrait enzymatique industriel de la présure (124.34 UP/ml).

Les résultats obtenus de l'étude des conditions optimales d'activité coagulante ont montré que :

- L'activité coagulante de l'extrait de poulet ainsi que celui de la présure atteint la valeur maximale à température de 70°C. Par contre, l'activité maximale de l'extrait de poisson est observée à température 65°C, et diminue au-delà de 70°C ;

- L'activité coagulante maximale est atteinte à valeur de pH égale à 6 pour les extraits de présure et pepsine du poulet, tandis que pour l'extrait pepsine du poisson (chinchard), elle est atteinte au pH 6.5 ;
- L'activité coagulante des extraits étudiés augmente avec l'augmentation de la concentration de chlorure de calcium jusqu'à atteindre la valeur maximale au voisinage de la concentration de 0.05M.

L'essai de fabrication d'un fromage frais par utilisation d'extraits testés a révélé que les fromages obtenus présentent des caractéristiques organoleptiques assez proches, avec des distinctions quant à la texture. Ceci est confirmé par le critère de tartinabilité des trois fromages d'où les résultats obtenus montrent que le taux de tartinabilité est plus élevé pour les deux fromages issus des extraits de poulet et du poisson contrairement à celui issu de la coagulation par la présure.

Au terme des résultats de l'étude sensorielle, il est observé que les deux extraits bruts de poulet et poisson, présentent des avantages qui leurs permettent de remplacer la présure dans la fabrication du fromage frais.

Pour conclure, nous pouvons dire que les résultats obtenus semblent intéressants d'autant qu'ils montrent la possibilité d'obtention des extraits enzymatiques capables de remplacer la présure dans l'industrie fromagère. Cependant il est intéressant de compléter cette étude par :

- L'étude des différents facteurs influençant l'extraction du système enzymatique afin d'améliorer la qualité et le rendement d'extraction ;
- La purification de l'enzyme coagulante afin d'envisager d'autres utilisations ;
- Essai de fabrication d'autres types de fromage tel que : le Camembert, l'Emmental, le Brie aux extraits pepsine du poulet et du chinchard.

Références bibliographiques :



- (ANONYME I) :Planetoscope - Statistiques : Production mondiale de fromage.
- (J.O.R.A.N °69, 2003).Arrêté interministériel du 18 aout 1993 relatif aux spécifications et a la présentation de certains laits de consommation. Textes législatifs. Lait et produits laitiers.
- (ONS, 2012). L'office national des statistiques (2012).
- Adoui F. (2007). Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir des proventricules de poulet. Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine, 64p.
- AFNOR, E. (1981). Association National des normalisations. Guide général pour la sélection, l'entraînement et le contrôle des sujets
- Ait Amer Meziane L., 2008. – Etude comparative de deux protéases coagulant les laits obtenus à partir du proventricule de poulet (*Gallus Gallus*) et de l'estomac de poisson (*SeriolaDumerili*). Mémoire Ing. Agro., Inst. Nat. Agro., El-Harrach.
- Al Kanhal HA (2010) Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal* 20:811-821.
- Alais C (1984) Principes des techniques laitières. *Science du Lait*:196-197.
- Alais C., (1984). Sciences du lait, principes des techniques laitières, 4 ème édition, SEPAIC, 818 p.
- Alais C., 1984.- Sciences du lait – Principes des techniques laitières. Ed. SEPAIC, Paris, 4^{ème}éd, 814p.
- Andren A. (2002). Rennets and coagulants in *Encyclopedia of Dairy Science*. Elsevier, p.281-286.
- Areces L.B., Bonino M.B.I, Parry M.A.A., Fraile E.R., Fernandez H.M.&Cascone O., 1992.- Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*.*Appl.Biochem. Biotechnol.*, 37: 283-294.
- Aworth O. C. and Muller H.G. (1987). Cheese making properties of vegetable rennet from Sodom apple *Calotropis procera*. *Food chemistry*, 26(1), pp: 71-79.
- Aworth O. C. and Nakai S. (1986). Extraction of milk enzyme from Sodom apple (*Calotropis procera*). *Journal of Food Science*, 51 (6), pp: 1569–1570.
- Azzouzi R. et Yaghla B. (2020). Etude comparative de deux protéases coagulant le lait, extraites de pro ventricules de poulet et de caillette d'ovine. Mémoire Master. Production et transformation laitière. Université 8 Mai 1945 Guelma, 72p.

B

- Balcones E., Olano A., Calvo Mm., (1996). Factors affecting the rennet clotting properties of ewe's milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44: 1993-1996.
- Barbano D., And Rasmussen M., R. R., (1992). Cheese yield performance of Fermentation-produced chymosin and other milk coagulants *J.dairy Sci.* 75:1-12.1992.
- Bayraktar H and Önal S (2013) Concentration and purification of α -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning. *Separation and purification technology* 118:835-841.
- Benyahia F. (2013). Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vu de la valorisation des proventricules de volailles au profile de la filière lait en Algérie. Thèse Doctorat, Université de Constantine, 118p.
- Benyahia F. (2013). Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vu de la valorisation des proventricules de volailles au profile de la filière lait en Algérie. Thèse Doctorat, Université de Constantine, 118p.
- Benyahia-Krid F, Attia H and Zidoune M (2010) Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: interactions and microstructure. *Journal of Agriculture, Biotechnology and Ecology* 3 :75-86.
- Berridge N.J. (1954). The purification and chrystallization of rennin. *Biochem.J* 39 :179- 186.
- Berridge N.J., (1955). 85 Purification and Assay of Rennin. *Methods in enzymologie* volume 2 pp 69-77 Ed., Perlmann G.E. and Lorand L, Acad.Press Inc., New York.
- Bohak Z. (1970). Chicken pepsinogen and chicken pepsin. In: *Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes.* Ed., Perlmann G. E and Lorand L, Acad.Press Inc., New York, 19: p347-358.
- Bohak Z. (1970). Chicken pepsinogen and chicken pepsin. In: *Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes.* Ed., Perlmann G. E and Lorand L, Acad.Press Inc., New York, 19: p347-358.
- Bohak Z., 1969.- Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(17): 4638.
- Bouazizi, A., Felfoul, I., Attia, H., & Karoui, R. (2022). Characterization of nettle leaves (*Urtica dioica*) as a novel source of protease for clotting dromedary milk by non-destructive methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 211, 112312.

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

C

- Cheftel J.C. et Cheftel H. (1977). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Tec et doc. Lavoisier, 381p.
- Collin J.C., Grappin R. et Legraet Y. (1977). Etude de la methode de mesure selon Berrigde, du temps de coagulation du lait additionné d'une sollution enzymatique. Rev. lait 355: 389-394.
- Cuvelier G. F. (1993). Production des enzymes In : Biotechnologie,Ed., Scriban R.(coordonnateur), 4ème édition, Lavoisier Tec et Doc, , 904 p.
- Cuvellier G.F. (1993) Production des enzymes in Biotechnologie. Coord Scriban R. 4ème édition Tec. Et Doc. Lavoisier PP948.

D

- D'Ambrosio A., Rossanos R., ungaro N. and Riccio P. (2003). proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from the crustaceans Munida. J.Mol.Catalys.B :Enzymatic 22 :143-146.
- Dalgleish DG (1992) Sedimentation of casein micelles during the storage of ultra-high temperature milk products—A calculation. Journal of dairy science 75 :371-379.
- Danley D.E. and Geoghegan F. (1988). Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin C*. The journal of Biological Chemistry, Vol 263 : 9785- 9789.
- Desmazeaud M. (1997) Les enzymes utilisées en industrie laitières PP582-602 in Laites et produits laitiers coord. Luquet F.M. Tech et Doc Lavoisier.

E

- Emmon D.B. and Beckett D.C. (1990) Milk clotting enzymes. 1. Proteolysis during chese making in rela4ion to losses of yield. J DairySci. 73 : 2007-2015.
- ErnstromC.A., And Wongt N.P., (1983). Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In: Fundamentals on dairy chemistry. Ed., B.H. Webb, A.H.Johnson and J.A. Alfold .2 ème ed., the Avipublishing Company Inc, p. 662-771, 929p.

F

- FAO. Alimentation et Nutrition N°28, « Lait et produits laitiers dans la nutrition humaine ». (2008).
- Farkye NY (2004) Cheesetechnology. International journal of dairytechnology57:91-98.
- Fezzani S., Chemmam A .et Ben salem M., 2006-Age et croissance du chinchard a queue jaune (*Trachurusmediterraneus*) dans la region nord de la tunisie, Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô, Vol. 33, Tunis, PP. 5-12.
- Filion M.M. (2006).Amélioration de la stabilité thermique du lait par modulation du potentiel d'oxydoréduction. Thèse doctorat. Université laval. 159p.
- FindlayC.J., Stainley D.W. and Emmons D.B. (1984). Chicken pepsin as a rennet substitute. Food Science and Technology Journal, 17 (2), 97-101.
- Flüeler O., And Puhanz., (1978). Neue Erkenntnisseüber die Labträglichkeit der Milch. SchweizerischeMilchwirtschaftlicheForschung7 :61-68.

G

- Garcia- Carreno F., 1992 a.- The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodesplanipes*, decapoda): their partial characterization and the effect of feed on their composition. *Compo. Biochem. Physiol. B*,103: 575-578.
- Garg S.K. & Johri B.N., 1994.- Rennet: current trends and future research. *Food Reviews International*, 10, pp. 313-355.
- Garnot P. et Martin P. (1980). Présure, composition, activité, son rôle en fromagerie. *Technique Laitière* 930 : 27-30.
- Gastaldi E., Pellegrini O., Lagaude A., And De La Fuente Bt., (1994). Functions of added calcium in acid milk coagulation. *Journal of food science* 59:310-312.
- Germonville A (2003) Coagulants. *Techniques de l'Ingénieur Agroalimentaire* (France).
- 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).
- GORDIN S. and ROSENTHAL I. (1978). Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *Journal of Food Protection* ; Vol. 41, N° 9 ; 684-688.
- Gourseaud J., 1993.- Coagulation enzymatique du lait. In:Scriban R. (coord.). *Biotechnologie*.Ed. Tec. & Doc., Lavoisier, Paris, 4eme éd., pp. 393-405.

- Green M.L. Valler M.J. Kay J. (1984) Assesment of the suitability for cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin preparations. Journal of dairy research (1984), 51, 331-340.
- Green M.L., Valler M.J. and Kay J. (1984). Assesment of the suitability for cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin preparations. Journal of Dairy Research 51 : 331-340.
- Green ML and Stackpoole A (1975) The preparation and assessment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase–swine pepsin mixture for Cheddar cheese-making. Journal of Dairy Research 42:297-312.
- Guillaume J., (1999)- Physiologie digestive et digestibilité des nutriments chez les poissons. In ; Guillaume J.& al. (Ed.). Nutrition et alimentation des poissons et crustacés. Ed. INRA, IFERMER, Fr., pp.51-86.

H

- Haard N.F., (1992)- A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. J. of Aquatic Food Product Technology, 1 (1): 17-31.
- Haard N.F., Shamsuzzaman K., Bewer P. & Arunchalam K., (1982).- Enzymes from marine organisms as rennet substitutes. In: Dupuy P. (Ed.). Use of enzymes in food technology. Symposium International Versailles, Paris, Fr.: 237-241.
- Hamrani L. (2008). Étude comparative de deux protéases coagulant le lait, extraites de pro ventricules de poulet (*Gallus gallus*) et d'estomacs de limon (*Seriolasp*). Mémoire Magister. Science Agronomique. INA., El-Harrach. 62p.
- Hipp N, Groves ML, Custer J and McMeekin T (1952) Separation of α -, β - and γ casein. Journal of dairy science 35:272-281.
- Honjo I., Kimura S. & Noraka M., (1990).- Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp *Penaeus indicus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 56 : 1627-1634.
- Horne D and Banks J (2004) Rennet-induced coagulation of milk. Cheese: Chemistry, physics and microbiology 1:47-70.
- Huppertz t., Upadhyayv.k., Kelly A.L. et Tamime A.Y. (2006). Constituents and Properties of Milk from Different Species. Brined Cheeses. Edited by Dr Adnan Tamime. Copyright © 2006 by Blackwell Publishing Ltd, p.1-34.

J

- Jacob M, Jaros D and Rohm H (2011) Recent advances in milk clotting enzymes. International journal of dairy technology 64:14-33.
- Janhøj T and Qvist K (2010) The formation of cheese curd, in Technology of cheesemaking pp 130-165, Wiley Online Library.
- Jeantet R, Croguennec T, Garric G and Brulé G (2017) Initiation à la technologie laitière, Editions Tec Doc Lavoisier.
- Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P. et Brule G. (2008). Les produits laitiers. Ed.tec et doc, lavoisier, 185 p.

K

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

L

- Libouga, D., Vercaigne-Marko D., Et Al., (2006). "Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*." ropicult 24(4) : 229-238.
- Lopes A., Teixeira G., Liberato M.C., Pais M.S & Clemente A., 1998.- New vegetal sources for milk clotting enzyme. J. Mol. Catal. B: Enzym., 5: 63-68
- Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.
- Lucey J (2002) CHEESE| Rennet Coagulation of Milk.
- Luquet (1987) lait et produit laitiers, vache, chèvre, 2P eme Pédition.
- Luquet F.M., 1985.- lait et produits laitiers : vache, brebis, chèvre. Tome II : Les produits laitiers – transformation et technologies. Ed. Tec. & Doc., Lavoisier, Paris, 656p.

M

- Maachou D. (2004). Extraction et purification de protéase coagulant le lait en vue de leur substitution à la présure traditionnelle : Essai d'obtention d'une protéase issue

d'estomac de poisson (*Serioladumerili*). Mémoire de Magister en Science Agronomie. Université de Boumerdès-M'hamed Bougara.

- Maachou D., (2004).- Extraction et purification de protéase coagulant le lait en vue de leur substitution à la présure traditionnelle : Essai d'obtention d'une protéase issue d'estomac de poisson (*Serioladumerili*). Mémoire Mag. Sces agro., Univ. M'Hamed Bouguerra (Boumerdas), 65p
- Macedo A., Malcata F.X. and Oliveira J.C. (1993). The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: A review, J. Dairy Sci. 76: 1725-1739.
- MADR, 2012. Avant-projet d'une charte de qualité et pacte de croissance encadrant et engageant les activités des professionnels de la filière avicole pour la structuration et la modernisation de l'aviculture nationale
- Mahaut M, Jeantet R and Brulé G (2000) Initiation à la technologie fromagère, Editions Tec & Doc.
- McMahon DJ, Richardson G and Brown R (1984) Enzymic milk coagulation: Role of equations involving coagulation time and curd firmness in describing coagulation. Journal of dairy science 67:1185-1193.
- Mechakra A., Auberger B., Remeuf F., et 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.
- Mehaia MA, Hablas MA, Abdel-Rahman KM and El-Mougy SA (1995) Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. Food chemistry 52:115-122.
- Meitton B., Desmazeaud M., de Roissart H. & Weber F., (1994).- Transformation du lait en fromage. In : de Roissart H. & Luquet F.M. (Coord.). Les bactéries lactiques (Vol.II).Ed. Loriga, Uriage, FR, pp.55-133.
- Morsli A. (1996). Recherches sur les activités protéasiques de l'extrait de *Cynarascolymus*, du latex de *Ficus carica* et de pro ventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Mémoire de Magister. Sciences Agronomique. I.N.A.El-Harrach
- Morsli A., (1997) Recherche sur les activités protéasiques des extraits de *Cynarascolymus*, du latex de *Ficus carica* et du proventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Thèse magister. I.N.A. El Harrach..Alger (Algérie).

- Moutilla A., Balcones E., Olano A., Calvo Mm., (1995). Influence of heat treatments on whey protein denaturation and rennet clotting properties of cow's and goat's milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43 : 1908-1911.

N

- Nouani A., Belhamiche N., Slamani R., Fazouane F., Belbraouet S. and Bellal M. M. (2009). Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Mucor pusillus*: Method comparison. *Europe an Journal of Scientific Research* 35 (4) :512-521.
- Nouani A., BelkhodjaR.,MaachouD.,Fernani L. &Bellal M.M., 2002.- Recherche et caractérisation de quelques succédanés de présure en vue de leur utilisation dans la technologie fromagère. Premier Séminaire international sur la qualité et la sécurité dans le secteur agroalimentaire, Blida, 13 et 14 mai.
- Nouani A., Hamrani L., Bellal M. M. (2011). Purification et caractérisation de protéase coagulant le lait extrait à partir du proventricule de poulet (*gallusgallus*). *African Journal of Biotechnology* 10(9) :1655-1665.

O

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

P

- Paez de Leon L, Pinzon G, Otaiza Vasquez E. *Acta Cient Vene Z.*, (1995). Purification and assay of chicken pepsin; PubMed - indexed for MEDLINE. 46: 237-41.
- Pan B.S., Lan C.C & Hang T.Y., 1991.- Changes in composition and proteolytic enzymes activities of *Artemia* during early development. *Comp.Biochem.Physiol. Part A*, 100:725-730

- Patel R and Reuter H (1986) Effect of sodium, calcium and phosphate on properties of rennet coagulated milk. *Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie= Food science+ technology*.

Q

- Queiroz-Macedo I., Faro C.J.& Pires E.M., 1993.- Specificity and kinetics of the milk clotting enzyme from cardoon (*Cyrana cardunculus* L.) toward bovine κ -casein. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1537-1540.

R

- Ramet J. P., (1997). Propriétés physiques du coagulum In : *Le fromage, de la science à l'assurance de qualité* Eck A., et Gillis J.C. (coordonnateurs) pp. 324-333, 3ème édition, Lavoisier Tec. & Doc, 891 p.
- Ramet J. P., and Weber F. (1980). Contribution à l'étude de l'influence des facteurs de milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le lait*, 60(591-592) :1-13.
- Ramet J.P. (1985). Study of enzymatic coagulation of Camel milk in Saudia-Arabia mission repport, FAO.
- Ramet J.P. (1985). Study of enzymatic coagulation of camel milk in Saudia-Arabia. Mission Report. FAO.
- Ramet J.P., 1990.- Les agents de transformation du lait. In: Eck A. (Coord.). *Fromage*. Ed. TEC.&Doc., 2eme éd., Lavoisier, Paris, pp. 101-105
- Reece P., 1988.- Recovery of proteases from fish waste. *Process. Biochem.*,6 :62-66.
- Robitaille G, Lapointe C, Leclerc D and Britten M (2012) Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropeptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. *Journal of dairy science* 95:1-8.

S

- Schmidt D (1982) Association of caseins and casein micelle structure. *Developments in dairy chemistry*.

- Schuck P, Mahaut M, Jeantet R and Brulé G (2000) Les produits industriels laitiers, Lavoisier TEC et DOC Editions.
- Scott R. (1981). Cheese making practice, Applied Science Publishers, London, p. 4-16
- Shamsuzzaman K.&Haard N.F., 1983.- Evaluation of harp seal gastric protease as a rennet substitute for Cheddar cheese. J. of Food Science, 48: 179-182.
- Siar H (2014) Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait. Mémoire de magister, université frères Mentouri Constantine. Institut de la Nutrition, Alimentation et des Technologies Agroalimentaires. 105p
- Slamani R. (2004). Optimisation d'une méthode d'extraction de la pepsine ovine. Essai de purification et caractérisation. Mémoire Magister. Sciences Agronomiques. INA.El-Harrach, 113 p
- Souaré, M. L., Traoré, L., Sidimé, Y., Sidibé, M., & Sangaré, A. (2017). Utilisation de la pepsine de chinchard (*trachurus mediterraneus*) dans la fabrication d'un fromage frais. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 44, 64-69.
- Sousa M. J. and Malcata F. X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheese from several milk species. Lait 82: 151-170.
- Stanley D. W., Emmons D. B., Modler H.W. and Irvine D. M. (1980). Cheddar cheese made with chicken pepsin. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 13, (2): 97-102.
- 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

- Tervala H-L, Antila V and Syväjärvi J (1986) Factors affecting the renneting properties of milk.
- Tunick MH (2008) Whey protein production and utilization: a brief history. Whey processing, functionality and health benefits:1-13.

V

- Valles E et Furet J.P (1977). Etude des caillètes de bovins a l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants a base de pepsine bovine. Lait, 61, 601-617.
- Veisseyre R. (1975). La technologie du lait, constitution, récolte, traitement et transformation du lait. Ed. Maison rustique, 3ème Ed, paris, 696 p.
- Vignola C.L., (2002). Science et technologie du lait ; édition Montréal, 600 p.
- Vilain, A. C. (2010). Qu'est-ce que le lait ? *Revue française d'allergologie*, 50(3), 124-127.
- Vioque M., Gomez R., Sanchez E., Mata C., Tejada L. and Fernandezsalguero J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewe's milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis*. *J. Agric.Food Chem.* 48: 451-456.

W

- Walstra P and Jenness R (1984) Dairy chemistry & physics, John Wiley & Sons.
- Walstra P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A. & Van Boekel M.A.J.S., 1999.- Dairy Technology: principles of milk properties and processes.

Références électroniques :

(ANONYME II) (<https://www.fao.org/3/X6551F/X6551F03.htm>)

Annexes

Annexe I : Appareillage

Appareillage utilisé au laboratoire

- Bain marie
- Balance
- Centrifugeuse
- pH mètre
- Agitateur magnétique
- Spectrophotomètre
- Mixeur

Avec une utilisation d'un certain matériel au cours de cette étude, on commence d'abord par l'équipement de protection individuelle qui est la plus importante et qui s'agit de (la blouse, gants, masque respiratoire...) et pour les petits matériels on cite ; spatule en inox, micropipette, eppendorfs, couteau..., ainsi que différents types de verreries (béchers, fioles jaugées, tubes à essais, tubes à centrifugation, éprouvette...)

Produits et réactifs spécifiques

- **Colorants et réactifs** : acide sulfurique, soude, tyrosine, phosphate de sodium monobasique et dibasique, bleu de coomassie G-250, TCA 5%, réactif de folin ciocalteu, tartrate de sodium-potassium, sulfate de cuivre, carbonate de sodium.

-Caséine 1%.

-Chlorure de calcium.

-Sérum albumin bovine (BSA).

- Lait en poudre 0% de matière grasse.

Annexe II : détermination de l'activité protéolytique (Green et stackpoole, 1975)

Préparation des solutions

- 1g de caséine dans 50ml de tampon phosphate (0.1M, pH7)
- **Préparation du tampon phosphate**
 - on mélange 1.77g de K_2HPO_4 +100ml de l'eau
 - 1.5 de + 100ml de l'eau
- 1ml de ce mélange+1ml d'extrait enzymatique
- Incubation au bain marie à 35°C pendant 20 min
- Addition de 5ml de TCA 5% pour arrêter la réaction, et laisser reposer pendant 15min a une température ambiante
- Ensuite l'ensemble est centrifugé (15min a 1500tours)
- Prendre 0.5ml du surnageant +2.5 de la solution C
- **Préparation de la solution C** : 100ml (A) + 2ml (B) (préparation immédiate)

-Solution (A) : 1g NaOH dans 250ml d'eau distillée + 5g Na_2CO_3

-Solution (B) : 0.1g sodium-potassium tartrate dans 10 ml +0.032g CuSO₄

- Incubation pendant 10 min à 35°C
- Ajouter 250µl de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué ½)
- Incubation à 35°C /20min, apparition d'une couleur bleue
- Lecture de l'absorbance à 660nm

Annexe III: dosage des protéines par la méthode (Bradford, 1976)

III-1 Préparation de réactif de BRADFORD

-100mg de bleu de Coomassie G-250.

-50 ml d'éthanol à 95%.

-100 ml d'acide phosphorique à 85%.

-compléter avec l'eau distillée jusqu'à un volume de 1000 ml.

Ce réactif doit être conservé à 4°C et à l'abri de la lumière.

III-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 µl. Toutes les dilutions des solutions protéiques sont effectuées en présence de l'eau distillée. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 500µl. Après addition de 2ml du réactif de Bradford et agitation,

La solution est laissée à l'obscurité 15min puis l'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc.

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

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

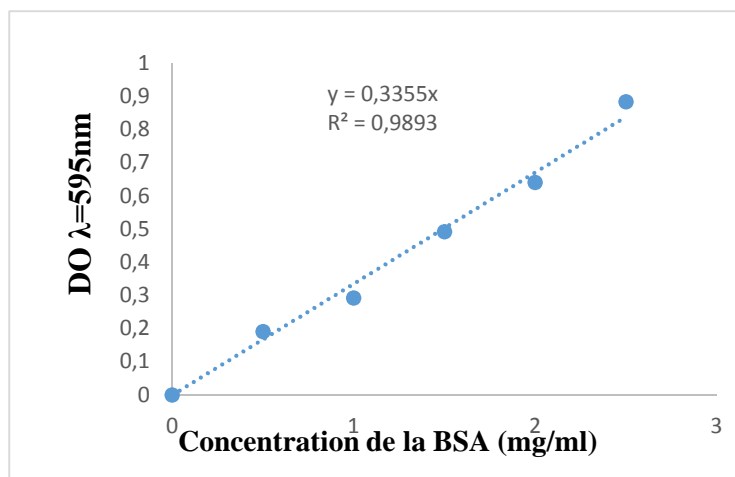


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de la solution de BSA (1mg/ml) Bradford, (1976).

Annexe IV: MESURE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

IV-1 Courbe d'étalonnage de la tyrosine

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

Numéro de tube	blanc	1	2	3	4	5
Dilution	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Tyrosine (µl)	0	800	600	400	200	0
Tampon phosphate 0.1M pH7 (µl)	1	200	400	600	800	1
Solution C (ml)	2.5					
Incubation à 35°C pendant 10 min						
Folin-ciocalteu (µl)	250					
Incubation à 35°C pendant 20min						
Lecture de l'absorbance a 660 nm						

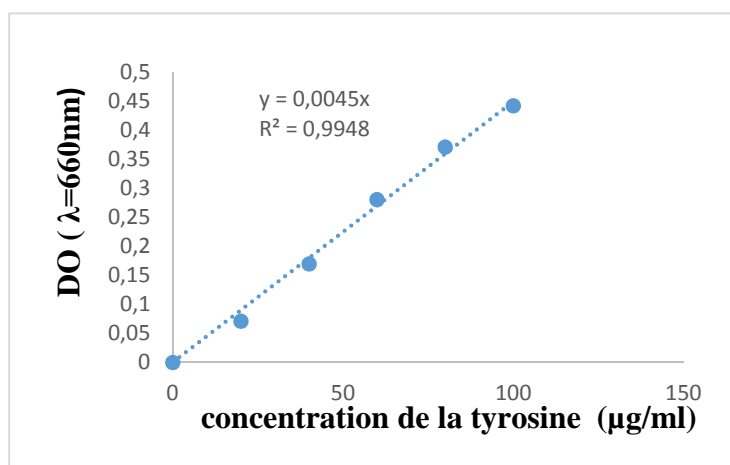


Figure 2 : Courbe d'étalonnage obtenu avec la tyrosine.

Annexe V : Exemple d'un questionnaire d'évaluation sensorielle

Date :.....

Sexe :.....

Trois échantillons de fromage frais codé 1 à 3 vous sont présentés. Il vous est demandé de cocher les cases correspondant à l'impression ressentie, selon l'intensité des descripteurs suivant :

Vers la fin il vous est demandé d'évaluer les échantillons en attribuant une note de 1 à 10.

I- Couleur :

1-Blanche

2-Beige

3- Verte

Echantillons	1	2	3
Note attribuée			

II- Odeur :

1- Absente

2- Faible

3- Moyenne

4- Forte

5- Très forte

Echantillons	1	2	3
Note attribuée			

III- Gout :

a- Gout acide :

1- Faible

2- Moyen

3- Fort

Echantillons	1	2	3
Note attribuée			

b- gout amère :

1- faible

2- moyen

3- fort

Echantillons	1	2	3
Note attribuée			

IV- Texture :

a- texture granuleuse

- 1-absente
- 2- faible
- 3-moyenne
- 4-forte
- 5-très forte

Echantillons	1	2	3
Note attribuée			

b- dureté

- 1- très molle
- 2- molle
- 3- moyenne
- 4- dur
- 5- très dur

Echantillons	1	2	3
Note attribuée			

c- tartinabilité

- 1- très facile
- 2- facile
- 3- moyenne
- 4- difficile
- 5- très difficile

Echantillons	1	2	3
Note attribuée			

V- Préférence

- 1- très désagréable
- 2- désagréable
- 3- ni agréable ni désagréable
- 4- agréable
- 5- très agréable

Echantillons	1	2	3
Note attribuée			

VI- Note attribuée

Echantillons	1	2	3
Note attribuée			

Résumé

L'objectif de la présente étude, est d'étudier la possibilité de substituer la présure par la pepsine extraite des proventricules de poulet de et la muqueuse stomacale du poisson comme agent coagulant du lait d'origine animal. Pour atteindre ce but une caractérisation des extraits enzymatiques obtenus est effectuée par la détermination de la teneur en protéines, l'activité coagulante, la force coagulante et l'activité protéolytique. L'influence des paramètres physico-chimiques du lait, à savoir le pH, la température, la concentration en CaCl_2 , sur l'activité coagulante, a été étudié, et les paramètres optimaux ont été alors déterminés. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait pepsine du poulet présente une activité coagulante de 273.2UP, et une activité protéolytique estimée à 358 $\mu\text{g/ml/min}$. La pepsine du poisson a présenté une activité coagulante de l'ordre de 10.99 UP, une activité protéolytique de 34.86 $\mu\text{g/ml.min}$. L'activité coagulante de la présure a été estimée à 124.34 UP. Un fromage frais a été préparé à partir d'un lait de vache cru, coagulé avec l'extrait de pepsine du poulet et du poisson. Les résultats de l'analyse sensorielle obtenus ont révélé une grande ressemblance sur le plan couleur et odeur. Néanmoins, certaines différences ont été constatées, notamment au niveau de la texture. Les résultats ont démontré que la pepsine du poulet et celle du poisson peuvent remplacer la présure dans la fabrication fromagère.

Mots clés : Présure, Pepsine, Coagulation, Fromage, Lait.

Abstract

The objective of the present study is to investigate the possibility of substituting rennet with pepsin extracted from chicken proventriculi and fish stomach mucosa as a coagulating agent for milk of animal origin. In order to achieve this goal, a characterisation of the enzymatic extracts obtained was carried out by determining the protein content, the coagulant activity, the coagulant strength and the proteolytic activity. The influence of the physico-chemical parameters of the milk, i.e., pH, temperature, CaCl_2 concentration, on the coagulant activity was studied, and the optimal parameters were then determined. The results obtained showed that the chicken pepsin extract had a coagulant activity of 273.2UP, and an estimated proteolytic activity of 358 $\mu\text{g/ml/min}$. Fish pepsin showed a coagulant activity of about 10.99 UP, a proteolytic activity of 34.86 $\mu\text{g/ml.min}$. The coagulant activity of rennet was estimated at 124.34 UP. A fresh cheese was prepared from raw cow's milk, coagulated with chicken and fish pepsin extract. The results of the sensory analysis obtained revealed a high degree of similarity in colour and odour. Nevertheless, some differences were found, especially in texture. The results showed that chicken and fish pepsin can replace rennet in cheese production.

Key words: Rennet, pepsin, coagulation, Cheese, Milk.