

Recherche de succédanés de la présure traditionnelle utilisés dans la coagulation du lait

Par

NOUANI Abdelouahab

Rapporteur : BELLAL Mohand Mouloud Professeur ENSA El Harrach
07 Juillet 2009

devant le jury composé de : Président : AMMOUCHE Ali Professeur ENSA El Harrach Examineurs :
YAKHLEF Hacene Professeur ENSA El Harrach MATI Abderrahmane Professeur Univ. Tizi ousou
RIAZI Ali Professeur Univ. Mostaganem BENALLAOUA Said Professeur Univ. Bejaia

Table des matières

PUBLICATIONS INTERNATIONALES : . . .	5
REMERCIEMENTS . . .	6
LISTE ALPHABETIQUE DES ABREVIATIONS : . . .	7
RESUME . . .	8
ABSTRACT . . .	9
INTRODUCTION GENERALE . . .	10
CHAPITRE II EXTRACTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA COAGULASE DE <i>MUCOR PUSILLUS</i> . . .	26
INTRODUCTION . . .	26
MATERIEL ET METHODE . . .	27
1- Obtention de l'extrait coagulant de <i>Mucor pusillus</i> . . .	27
2- Méthodes analytiques . . .	29
3- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du dodecyl sulfate de sodium (SDS- PAGE) . . .	30
4- Séquence des acides amines de la protéase . . .	30
5- Caractérisation de l'extrait coagulant purifié . . .	31
RESULTATS ET DISCUSSION . . .	32
1 – Purification de l'extrait coagulant de <i>Mucor pusillus</i> . . .	32
2– Caractérisation de l'extrait fongique purifié et de la présure . . .	44
3 – Activité protéolytique . . .	51
4- Estimation du poids moléculaire . . .	52
CONCLUSION . . .	55
CHAPITRE III CARACTERISATION DES EXTRAITS COAGULANTS PURIFIES OBTENUS A PARTIR DES FLEURS D'ARTICHAUT (<i>CYNARA SCOLYMUS</i>) ET DU LATEX DE FIGUIER (<i>FICUS CARICA</i>) EN VUE DE LEUR UTILISATION DANS LA FABRICATION DES FROMAGES TRADITIONNELS EN ALGERIE . . .	57
INTRODUCTION : . . .	57
MATERIEL ET METHODES . . .	58
1. Matériel biologique et extraction des enzymes coagulantes . . .	58
2. Méthodes . . .	59
RÉSULTATS ET DISCUSSION . . .	60
1- Résultats des extractions et caractères physicochimiques . . .	61
2- Résultats de la purification . . .	63
3- Activité protéolytique . . .	63
4. Propriétés des extraits purifiés . . .	65
CONCLUSION . . .	72
CHAPITRE IV : ETUDE COMPARATIVE DE DEUX PROTEASES COAGULANT LE LAIT, EXTRAITES DE PROVENTRICULES DE POULET (<i>GALLUS GALLUS</i>) ET D'ESTOMACS DE LIMON (<i>SERIOLA SP.</i>). . .	73
INTRODUCTION . . .	73
MATERIEL ET METHODES . . .	74
I. Matériel biologique . . .	74
II. Extraction des enzymes . . .	75

II.1 Activation de la pepsine avicole et marine . . .	75
II.2 Clarification des extraits enzymatiques . . .	76
III. Méthodes de purification . . .	76
IV- Caractérisation des extraits coagulants bruts et purifiés . . .	76
RESULTATS ET DISCUSSION . . .	76
I. RESULTATS DES EXTRACTIONS . . .	77
II. PURIFICATION DES EXTRAITS COAGULANTS BRUTS . . .	78
III. Caractérisation des extraits coagulants purifiés et de la présure . . .	84
CONCLUSION . . .	93
CHAPITRE V : APPLICATION FROMAGERE . . .	95
Première expérience : . . .	95
INTRODUCTION : . . .	95
METHODOLOGIE . . .	95
Méthodologie de la dégustation . . .	96
RESULTATS ET DISCUSSION . . .	96
1- Physicochimie du fromage . . .	96
2- Analyse sensorielle . . .	97
Deuxième expérience : . . .	99
INTRODUCTION . . .	99
METHODOLOGIE . . .	100
RESULTATS ET DISCUSSION . . .	102
Discussion . . .	107
CONCLUSION . . .	108
CONCLUSION GENERALE . . .	110
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES . . .	114
ANNEXES . . .	138

PUBLICATIONS INTERNATIONALES :

A Nouani ^{a,b}, N. Belhamiche ^b, R. Slamani ^c, Fazouane F ^a, S. Belbraouet ^d, MM.Bellal ^b

Purification et caractérisation électrophorétique d'une protéase coagulant le lait de *Mucor pusillus*: comparaison de méthodes. *European Journal of Scientific Research*, Vol. 35, N 4, 2009).

A Nouani ^{a*}, N. Belhamiche ^b, R. Slamani ^c, S. Belbraouet ^d, M. M. Bellal ^b - Extracellular protease from *Mucor pusillus*: Purification and characterization (*International Journal of Dairy Technology*, Vol. 62, p 112-117, 2009)

Nouani, A; Morsli, A, Dako, E, Belhamiche, N; Belbraouet, S; Bellal, MM - Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria (*Journal of Food Technology* 7 (1): 20-29, 2009)

COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

FAZOUANE F, NOUANI A , ABDELLAOUI R, TALANTIKIT S - Caractérisation d'une enzymes coagulant le lait d'*Aspergillus niger* isolée de la région de Boumerdes. Identification et séquençage de la souche- *Colloque International sur les Biotechnologies*. Oran 24 et 25 novembre 2007.

NOUANI A, CHERFAOUI L, OUICHER S, BELLAL M.M – Extraction , purification and characterization of the milk clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*) flowers. *International Symposium on Biotechnology, Sfax, TUNISIA, May 4th - 8th , 2008.*

NOUANI A , BELLAL M.M– Rendement de purification et masse moléculaire d'une protéase de *Mucor pusillus* : Comparaison de méthodes. *Séminaire international sur la filière lait. Université de Chlef, les 2 et 3 Décembre 2008.*

NOUANI A, HAMARANIL, AIT AMEUR MEZIANE L, BELLAL MM - Etude comparative de deux protéases coagulant le lait obtenues à partir du système digestif de poulet (*Gallus gallus*) et de limon (*Seriola sp*) et aptitudes fromagères des laits de chèvre et de brebis. *Séminaire International : La Biotechnologie au service du Secteur Agroalimentaire SIBA 2008, Blida le 17-18 JUIN 2008.*

NOUANI, A, MORSLI, A, DAKO, E, BELHAMICHE, N; BELBRAOUE, S; BELLAL, MM; A. DADIE

Effet des extraits coagulants enzymatiques purifiés des fleurs d'artichaut (*Cynara scolymus*) et du latex de figuier (*Ficus carica*) dans la fabrication des fromages traditionnels en Algérie. *4th IDF Dairy Science and Technology. 20-24 April 2009. Rennes. Agrocampus (France).*

REMERCIEMENTS

Un travail de thèse est rarement celui d'une seule personne. Aussi, je souhaite témoigner à tous les étudiants que j'ai encadré ou coencadré qui m'ont permis de terminer cette thèse et qui ont apporté leur grande contribution à la réalisation de ce travail, ma profonde reconnaissance en particulier *Mlle BELHAMICHE Nabila, Mlle HAMRANI Lamia, Mlle AIT AMEUR Leila*. Bonne continuation pour la suite de votre thèse.

A mon directeur de thèse, le Professeur BELLAL Mohand Mouloud, j'adresse ma reconnaissance pour ces conseils scientifiques judicieux, sa disponibilité exceptionnelle, et la liberté d'action qu'il m'a laissée tout au long de ce projet.

Je tiens en particulier à remercier :

- Monsieur le *professeur AMMOUCHE Ali* pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury d'examen de cette thèse.

- Monsieur le *Professeur MATI Abderrahmane* de l'université de Tizi Ouzou, non pas seulement pour avoir accepté de juger ce travail mais surtout pour ses aides précieux et ses orientations, sa disponibilité et son soutien constant.

Que les professeurs BENALLAOUA Saïd, RIAZI Ali et YAKHLEF Hacène trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de participer au jugement de ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier mon ami et frère le *Professeur Slimane BELBRAOUE*T responsable de l'ESANEF de l'Université de Moncton (Canada) pour m'avoir invité et accueilli dans ses laboratoires et dans ... sa maison.

J'exprime ma reconnaissance au professeur *Etienne DAKO* de l'ESANEF (Canada) pour son aide, son accueil dans *le laboratoire de Sciences des Aliments* et son aimable collaboration.

Mes remerciements également au personnel et à mes collègues du *département de Technologie alimentaire de l'UMBB* pour leur amitié.

Je tiens enfin à adresser un remerciement à *ma femme et mes enfants* pour leur patience tout au long de ces années.

LISTE ALPHABETIQUE DES ABREVIATIONS :

B.S.A.	: Bovine sérum albumine
Da	: Dalton
D. E. A. E.	: Diethyl-amino ethyl
E.E.B.	: Extrait enzymatique brut
F	: Force coagulante
Log (Ve)	: Logarithme du volume d'élution
NPN	: Azote non protéique
ODS	: Octadecylsu
P. A. G. E.	: Polyacrylamide gel electrophoresis
PM	: Poids moléculaire
P.S.A.	: Persulfate d'ammonium
Q. E. A. E.	: Quaternary-amino-ethyl
Rf	: Rapport frontal
RP-HPLC	: Reverse phase – High pressure liquid chromatography
S. D. S.	: Dodecyl Sulphate de sodium
T.E.M.E.D.	: N, N, N', N' - tetraméthylène diamine
US	: Unité Soxhlet
UP	: Unité de présure
UP /ml	: Unité de présure par millilitre
Ve	: Volume d'élution
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Sulfate d'ammonium

RESUME

L'obtention d'une protéase coagulant le lait a été réalisée par culture en surface de *Mucor pusillus*. L'extrait brut présente une force coagulante de l'ordre de 1 /1200.

Des essais de purification de l'extrait coagulant ont été réalisés. Le meilleur rendement en activité a été obtenu par une chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100 de l'extrait brut lyophilisé. L'électrophorèse sur PAGE-SDS a révélé une seule bande protéique homogène, caractérisée par un poids moléculaire de l'ordre de 49 000 Da et l'analyse protéomique avec une séquence de 427 acides aminés confirme un PM de 46000 Da.

Les conditions optimales d'activité coagulante ont été déterminées. L'activité est maximale à pH 5, à une température de 50°C et pour une concentration en CaCl₂ du lait de 0,02 M. L'enzyme est relativement stable dans l'intervalle de 30°C à 50°C pendant 30 mn d'incubation ainsi qu'aux basses températures. Ces propriétés sont relativement similaires à ceux de la présure traditionnelle, exception faite pour la température.

Les fromages artisanaux à base des laits de petits ruminants font partie des habitudes alimentaires des populations des régions à vocation agricole du nord et du sud Algérien. Les produits sont préparés à partir d'une macération de plantes cultivées comme l'artichaut, les grains de citrouille de la sève de figuier et parfois d'extraits de caillettes séchées des estomacs d'animaux. Une saveur prononcée de plantes et une conservation limitée caractérisent ces fromages. A travers ce travail, les propriétés des extraits purifiés ont été étudiées, il s'agit d'une purification par chromatographie d'exclusion sur *Sephacryl S-200* et d'un passage sur gel *Sephadex G-50* pour décolorer les extraits à pigmentation excessive ainsi que la mise en évidence des effets des différents paramètres (pH, température, concentration en enzyme et en CaCl₂) sur l'activité coagulante des enzymes. Le extrait végétal purifié connu comme des *aspartyls protéases* sont actifs en milieu acide, supportent des températures des laits élevées (80°C) et possèdent une activité protéolytique croissante sur la caséine entière bovine, par rapport à la présure commerciale. Comme la présure, les extraits sont relativement stables au stockage à basse température. Dans un autre volet de l'étude relative aux succédanés d'origine animale, deux pepsines avicole et marine, coagulant le lait, ont été obtenues par macération de pro ventricules de poulet (*Gallus gallus*) et de l'estomac de limon (*Seriola sp.*). Ces deux enzymes se caractérisent par une force coagulante de l'ordre de 1/3200 pour l'extrait enzymatique brut de poulet et de 1/545.45 pour celui de limon. Des essais de purification ont été réalisés sur ces deux pepsines. Il en ressort que l'extrait brut lyophilisé de limon présente un meilleur rendement en activité (13,10%) que celui de poulet (8,06%) après une chromatographie échangeuse d'anions et celle de l'exclusion moléculaire.

Les conditions optimales d'activité coagulante ont été déterminées. L'activité est maximale :

A pH 5 pour les deux pepsines. A une température du lait égale à 40°C pour la pepsine de poulet et 45°C pour la pepsine de limon. A une concentration en CaCl₂ du lait de l'ordre de 0.02M pour la pepsine de poulet et 0.04M pour la pepsine de limon. Ces deux enzymes sont relativement stables dans l'intervalle de 30°C à 40°C après 30 mn d'incubation.

Ces propriétés sont relativement similaires à celles de la présure, exception faite pour la concentration en CaCl₂ du lait en ce qui concerne la pepsine de limon.

Mots-clés : Protéases de *Mucor pusillus*, ficine, cynarase, poisson, poulet, purification, caractérisation, coagulation du lait, présure.

ABSTRACT

Chronic shortages in rennet have led to the use of enzyme preparations from various biological origins and capable of undergoing a milk-clotting process similar to that catalysed by calf rennet.

The obtaining of the milk-clotting protease was carried out by solid-state culture of the strain of *Mucor pusillus*. The crude extract show clotting strength about 1 / 1200. The purification tests of the clotting extract were realised. A better recovery was obtained by molecular size chromatography on Sephadex G-100 of the lyophilised crude extract. The SDS- PAGE data was reveal a single homogeneous band, characterised by its molecular weight measured about 49 000 Da and confirmed by proteomic analysis which found a MW about 46 kDa. The clotting optimal conditions activities were determined. The activity is maximum at a pH 5, at a temperature of 50°C and for a d 0,02 M CaCl₂ concentration. The enzyme is relatively stable from 30°C at 50°C after 30 mn incubation period and at low temperature of conservation. These properties were relatively similar with the rennet one except for the temperature. Artisanal cheeses made with milk from small ruminants form a part of the eating habits of the people in the agricultural regions of northern and southern Algeria. The products are prepared from a maceration of cultivated plants such as artichoke, pumpkin seeds, fig tree sap and sometimes from the extracts of dried rennet. A strong plant flavor and limited conservation are characteristics of these types of cheese. The properties of purified extracts were studied in this research. The process involved purification by exclusion chromatography on *Sephacryl S-200*, and a *Sephadex G-50* gel treatment to discolor the excess pigmentation as well as to highlight the effects of the various parameters (pH, temperature, enzyme and CaCl₂ concentration) on the coagulant activity of the enzymes. The purified plant extracts known as *aspartic proteases* are active in an acid medium, tolerate high milk temperatures (80°C) and have an increasing proteolytic activity on full-cream bovine casein as compared to commercial rennin. Like rennin, the extracts are relatively stable when stored at a low temperature. In another hand and during the last two decades, aquatic organisms and chicken have been recognized as a new source of rennin. In our study, Two milk-clotting pepsins (chicken and marine), were obtained by maceration of chicken proventricles (*Gallus gallus*) and yellowtail stomachs (*Seriola sp.*). This two enzymes show a clotting strength about 1/3200 for chicken crude extract and 1/545, 45 for yellowtail crude extract.. The purification tests were realised on the two pepsins. It's resort that the lyophilised crude extract of yellowtail shows a better recovery (13, 10%) than the chicken one (8, 06%) after exchanging anions and molecular seize chromatography. The clotting optimal conditions activities were determined. The activity is maximum at A ph 5 for the two pepsins, A temperature of 40°C for chicken pepsin and 45°C or yellowtail pepsin, A 0,02M for chicken pepsin and 0,04 M for yellowtail pepsin CaCl₂ concentration of milk.. The two pepsins were relatively stable between 30°C AT 40°C after 30 mn incubation periods. These properties were relatively similar with rennet; exception made for CaCl₂ concentration of milk which concern yellowtail pepsin.

Keys words: *Mucor pusillus*, proteases, *cynarase*, *ficin*. *Chicken*, *fish*, purification, characterisation, milk-clotting, rennet.

INTRODUCTION GENERALE

L'Algérie importe la quasi totalité de la présure traditionnelle obtenue à partir de la caillète de veaux de lait nécessaire à l'industrie fromagère. La valorisation des sous produits d'origine animale, microbienne ou fongique dans la préparation des enzymes de substitution constitue une autre alternative pouvant susciter un intérêt industriel en fromagerie locale, d'autant plus que l'Algérie se classe comme le plus gros consommateur de laits et dérivés au Maghreb avec 110 l/an/habitant selon les données statistiques du Ministère du Commerce de l'année 2005.

Dans le monde, le projet des succédanés de la présure entamée depuis longtemps visait la préparation d'enzymes coagulant le lait à partir de sources potentielles identifiées, peu coûteuses et d'origine diverse. Ce sont les substrats de sous produits animaux (abats de poissons , proventricule de poulet, ovins, pepsine bovine...) , végétaux (chardon, latex de figuier, cardon, graines de melon,...) ou microbiens (Champignon, bacillus, actinomycetes ...). Les matières premières utilisées sont disponibles et peu valorisées. Les caractéristiques biochimiques des extraits à coaguler le lait sont comparées à celle de la présure traditionnelle. La purification, la caractérisation, l'optimisation des procédés d'extraction , de conservation et d'utilisation des différents extraits sont comparativement à étudier suivis d'une approche des aptitudes technologiques sur différents laits des extraits coagulants .

Par ailleurs, l'Algérie dispose d'un potentiel de co-produits d'abattage très variés. A titre indicatif, en 1999, 1.619.488 têtes du cheptel ovin ont été abattues. Cette opération d'abattage permettait ainsi, d'obtenir en plus de la carcasse, un ensemble de co-produits dont une grande partie serait utilisée directement en alimentation humaine. Néanmoins, aucune voie de valorisation en vue d'une meilleure exploitation n'a été envisagée à ce jour .

Parmi les voies de valorisation des co-produits d'abattage d'ovins, de bovins, de poulets , ou de transformation de poissons, la production d'enzymes coagulants le lait à partir des estomacs des animaux, constitue un exemple d'intérêt. Bien que notre pays se classe comme un grand consommateur de lait comme cite précédemment, il n'en demeure pas moins que la production fromagere reste bas compare aux pays de l'Afrique selon la FAO (1994 ; 2003) (Tableau I.1).

Tableau I.1 : Production totale de fromage (Tonne métrique) en Afrique (FAO, 1994 ; FAO, 2003)

Pays1994	2003	Pays1994	2003
Algeria 1045	2000	Angola 1007	
1007	Botswana 1498	5000	Egypt
333950	498000	Eritrea 216	- Ethiopia
4600	6000	Kenya 210	- Mauritania 1664
2000	Morocco 6947	8000	
		Namibia 70	- Niger 12064
		15000	Nigeria 7022
		8000	South Africa 38000
		38000	Sudan
		72479	152000
		Tanzania 1200	
		3000	Tunisia 7060
		14000	Zambia
		1069	1069
		Zimbabwe 5197	2000

Dans ce chapitre qui rend compte des travaux réalisés sur les présures de remplacement, Nous nous proposons donc, dans un premier temps, de faire quelques rappels sur les protéases de manière générale puis nous focaliserons notre introduction

sur les coagulants utilisés dans l'industrie fromagère, notamment ceux provenant de micro-organismes et de plantes comparés aux coagulants animale dont nous exposerons de manière cohérente l'aspect biochimique de la chymosine qui constitue l'enzyme de référence dans l'étape des mécanismes de la coagulation des laits.

Quelques notions biochimiques sur les protéases

Les peptidases sont nombreuses, représentant environ 2% de tous les produits géniques (**RAWLINGS et BARRETT, 1999**) et environ 10% des enzymes réunies dans la liste « EC ». Les protéases ou peptidases sont des enzymes protéolytiques qui catalysent l'hydrolyse de liaisons peptidiques. Dans certains cas, les enzymes sont hautement spécifiques et hydrolysent une unique liaison peptidique d'une protéine donnée. Dans d'autres cas, les peptidases hydrolysent plusieurs liaisons peptidiques qui présentent une séquence ou conformation déterminées. Les peptidases ont une ample distribution, pouvant être rencontrées chez tous les organismes vivants. Elles participent à un grand nombre de processus biologiques dont le clivage de pro-hormones permettant leur activation, la coagulation sanguine et fibrinolyse, l'assemblage de structures macro-moléculaires comme les fibres de collagène, la fertilisation et la digestion de protéines, entre autres (**NEURATH, 1984**).

Les protéases sont divisées en deux groupes : d'une part les exopeptidases qui réalisent une hydrolyse à partir des extrémités d'un peptide et d'autre part, les endopeptidases (ou protéinases) qui hydrolysent une liaison peptidique interne. Cette nomenclature est schématisée dans la **figure I.1**

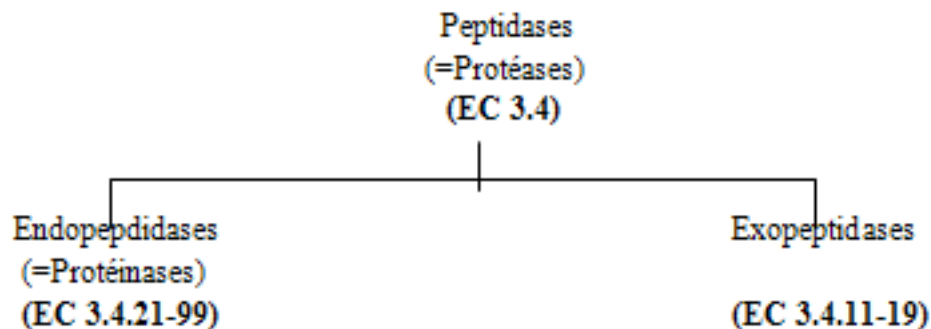


Figure I.1 : Schéma représentant la nomenclature des peptidases selon **BARRETT (1998)**.

Les peptidases à acide aspartique, enzymes qui constituent le groupe de coagulases par excellence sont très différentes des peptidases à sérine, à cystéine et à thréonine, dans la mesure où le nucléophile qui attaque la liaison peptidique est une molécule d'eau activée. Les résidus, impliqués dans le mécanisme catalytique, sont des acides aminés qui agissent comme des ligands. Les peptidases à aspartate sont ainsi dénommées car des résidus d'acide aspartique sont les ligands de la molécule d'eau activée (**figure I.1**). Le meilleur exemple en est certainement la pepsine, enzyme responsable pour la digestion des protéines alimentaires dans l'estomac des animaux supérieurs et qui est sans aucun doute la protéinase à acide aspartique la plus étudiée

Dans le même contexte que la pepsine, il est bien connu que le principal agent coagulant le lait est la Chymosine, c'est la principale enzyme de coagulation du lait présente dans la présure. C'est une protéase à acide aspartique qui hydrolyse spécifiquement la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la protéine caséine κ du lait dont l'utilisation est confrontée à la

contrainte de sacrifice des jeunes veaux. En conséquence l'industrie fromagère subit une crise dans l'approvisionnement de ce coagulant et cette situation a donné une impulsion aux recherches sur les enzymes de remplacement de la présure dont les premiers travaux remontent aux années 80 et même avant. Ils concernent diverses sources potentielles de protéases (**MARTIN et al., 1980; HASHEM, 1999 ; ARIMA et al., 1970; MARTIN et al., 1980; OTTESEN et RICKERT, 1970; BROWN et al., 1990 ; ARECES et al., 1992; VENERA et al., 1997 ; SARDINAS, 1968**). Pour toutes ces raisons, l'industrie fromagère en général et algérienne en particulier a recours aux importations de la présure animale en se heurtant ainsi à un autre problème qui est celui des sorties en devises et qui ne cesse d'augmenter de plus en plus. La motivation engendrée par un souci d'économie, du syndrome de la sécurité alimentaire en matière de pathologie et de besoins nutritionnels des populations et à l'heure ou nous mettons sous presse ce document, des recherches continuent à être menées sur des sous produits que la biodiversité naturelle a généré (**MOHAMMED et al., 2008 ; ADDIS et al., 2008 ; KONUSPAYEVA et al., 2008 ; PINO et al., 2008 ; CHWEN-JEN SHIEH et al., 2009**).

Etat de la recherche sur les sources potentielles de protéases

A l'heure de la crise d'approvisionnement en enzymes de coagulation du lait, seules la pepsine bovine et porcine présentaient un intérêt industriel suivi des enzymes d'origine microbienne. Les deux premières se sont révélées adéquates et sont, par conséquent, largement utilisées en fromagerie sous forme de mélange avec la présure. A l'heure actuelle, la chymosine transgénique demeure un substitut d'excellence.

Parmi les voies de substitution de la présure, la production d'enzymes coagulant le lait partir de la culture microbienne, suscite un intérêt pour la fromagerie locale et dans le monde où plusieurs souches de microorganismes font l'objet de productions industrielles de protéases coagulantes, *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, *Endothia parasitica*, *Irpex lacteus*, *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces lactis* et *Escherichia coli* (**OLSON 1995; CHANNE et SHEWALE,1998**). Des études comparatives de ces enzymes coagulantes et de la chymosine ont indiqué de grandes similarités dans le mécanisme de la coagulation du lait et plusieurs variétés de fromages préparées avec ces extraits sont semblables à ceux obtenus avec la présure traditionnelle (**DESMAZEAUD et SPINLER, 1997 ; RAMET, 1997 ; GOURSAUD, 1999**) . Dans le souci d'améliorer les rendements de production et la réduction de l'activité protéolytique qui affecte la qualité des fromages, des études récentes font toujours l'objet de travaux sur la recherche de nouvelles sources microbiennes (**CAVALCANTI et al. 2004; ALAM et al. 2005 ; ESAWY et al., 2006 ; CHWEN-JEN SHIEH A , 2009**). Les mécanismes biochimiques par lesquelles ces enzymes sont produites, le processus de purification ont été largement étudiés.

Au même titre que toutes les autres industries alimentaires, la fromagerie subit des pressions provoquées d'une part par des exigences croissantes du marché et d'autre part, par la nécessité impérieuse de rentabiliser ses opérations de transformation. L'objectif qui en résulte est de définir de nouvelles conditions de fabrication fromagère permettant d'obtenir un produit de qualité organoleptiquesatisfaisant et au prix de le plus compétitif.

Ainsi on cherche de plus en plus à découvrir et à mettre au point des produits de remplacement de la présure, susceptibles de remplir un certain nombre de conditions dont les principales sont les suivantes :

- prix nettement inférieur à celui de la présure de veau
- résultats comparables à ceux que l'on obtient avec la présure ordinaire dans la fabrication des fromages.

- garantie d'hygiène et de non toxicité.

Cette situation de pénurie prévaut depuis plus de 40 ans . Elle a été clairement définie et officiellement étudiée par la F.A.O. en Avril 1986 sous la forme d'une consultation sur la pénurie mondiale de présure dans la fabrication fromagère .Ce rapport a fait une large place à l'étude de substituts de présure d'origine animale (pepsine), microbienne et fongique.

L'apparition de techniques nouvelles plus performantes, grâce au développement de la Biotechnologie , a pu remédier à ces problèmes en apportant des solutions plus fiables et maîtrisables. Actuellement de nombreux travaux de recherches sur les enzymes coagulantes de substitution ont été réalisés et ce pour répondre aux besoins de l'industrie laitière.

Parallèlement aux travaux menés sur les présures de remplacement d'origine animale et fongique et depuis la dernière décennie, l'intérêt porté sur les enzymes de remplacement d'origine végétale a permis de valoriser la recherche par des essais de fabrication à grande échelle de divers types de fromages locaux portant le label du terroir dans de nombreux pays du bassin méditerranéen et de l'Amérique du sud (**LOPES et al., 1998**). Par ailleurs , des travaux très récents menés sur des substrats de plantes ont été publiés montrant le nouvel intérêt que suscite les protéases d'origine végétale (**EGITO et al., 2007; TEJADA et al., 2008; Chazarra et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2008; LOW et al., 2006**). Auparavant, le genre *Cynara L* a fait l'objet de plusieurs fabrication de fromage a base de lait de chèvre (**BARBOSA et al., 1976**) et plusieurs espèces végétales ont été identifiées, *Ananas comosus* (**CATTANEO et al., 1994**), *Calotropis procera* (**SANNI et al., 1999**), *Opuntia phylloclades*, *Cereus triangularis*, *Euphorbia caducifolia*, *Ficus bengalensis*, *F. elastica*, *E. hista*, *Ficus carica* (**UMAR DAHOT et al., 1990; ONER ET AKAR ,1993**), *Lactuca sativa* (**LO PIERO et al., 2002**), *Cynara scolymus* (**SIDRACH et al., 2005**) , *Cynara. cardunculus* (**SOUSA et MALCATA, 2002**), *Helianthus annuus* (PARK et al., 2000), *Albizia lebbeck* (**EGITO et al., 2007**).**LOPES et al. (1998)** avait étudié les différentes de la partie de la plante de sept especes de la famille des papilionacées (*Eriosema shirensense*, *E. ellipticum*, *E. pauciflorum*, *E. gossweilleri*, *E. psoraleoides*, *Adenolichos anchietae* and *Droogmansia megalantha*) , des activités protéolytiques et coagulantes ont ete mis en évidence dans les extraits de feuilles et de racines. Des essais de purification plus poussée et une connaissance plus approfondie des mécanismes biochimiques de ces enzymes sont devenus le centre d'intérêt des chercheurs. En Algérie, la fromagerie traditionnelle a toujours utilise des extraits coagulants végétaux a l'état brut obtenus a partir de la sève de figuier, des fleurs d'artichaut et du cardon ou des graines de citrouille pour la préparation des fromages frais. Ce sont le *Djeben* a base de lait de chèvre et de brebis dans le nord algérien, le *Kemaria* a base de lait de vache , de chèvre et parfois de la chamelle au sud dont **QUEZEL et SANTA (1962)** ont établi la liste de la flore a pouvoir coagulant des régions du nord et des régions désertiques . Les produits sont destinés au marché et a la consommation locale et demeurent une forme de valorisation des laits issu des différents cheptels.

Avec l'avènement de la biologie moléculaire et la connaissance parfaite des propriétés structurales et des sites actifs de ces enzymes , il en résulte que les recherches menées sur les protéases d'origine fongique (*Mucor*, *Endothia*, *Aspergillus*,...) sont les plus fructueuses (**FOLTMAN , 1981**) par rapport aux protéases acides d'origine animale notamment les pepsines bovines et porcines. Pour **GRIPON (1985)**, la conception de nouvelles stratégies d'utilisation des protéases pourrait contribuer à faire redémarrer cette utilisation industrielle dans les systèmes de bioconversion et dans la chimie des polymères naturels.

Sur le microbien, les recherches ont été entamées bien auparavant et les principaux champignons, sources de protéases à acide aspartique, sont *Endothia parasitica* (SARDINAS, 1968), *Rhizopus chinensis* (FUKUMOTO *et al.*, 1967), *Penicillium janthinellum* (HOFMANN et SHAW, 1964), *Mucor pusillus* (ARIMA *et al.*, 1968) et *Mucor miehei* (STERNBERG, 1971). *Rhizopus chinensis*, *Mucor pusillus* et *Mucor miehei* appartiennent à la sous-division « zygomycotina », classe des « zygomycètes », ordre des « Mucorales ». *Endothia parasitica* et *Penicillium janthinellum* appartiennent à une autre sous-division « ascomycotina ». ARIMA *et al.* (1967) ont montré que *Mucor miehei* var. *Lindt*, moisissure thermophile isolée de sols chauds et humides, était l'espèce la plus productrice de protéases à acide aspartique parmi 800 autres espèces de divers micro-organismes testés. Les résultats de ces travaux ont trouvé une application dans l'industrie fromagère, selon STERNBERG (1976), déjà en 1974, 60% des fromages produits aux Etats-Unis étaient fabriqués avec les protéases provenant d'*Endothia parasitica*, de *Mucor pusillus* et de *Mucor miehei*. Ce rapide succès est dû en partie à leurs prix compétitifs, ne représentant que 45% du prix d'acquisition de la présure traditionnelle.

La majorité des enzymes coagulant le lait sont connus comme des protéases à aspartate et sont distribués d'une façon endémique chez la plupart des vertèbres, plantes, levures, parasites, fungi et virus (DAVIES, 1990 et DUNN, 2002). Dans une revue de la littérature,rapporte que cette classe de protéases révèle dans leurs structures la présence de deux résidus aspartyles (Asp₃₂ et Asp₂₁₅) au niveau de leurs sites actifs (TANG et al., 1973) et le haut degré de similitude de structure confère à ces dernières des actions analogues sur les caséines des laits. En effet, la structure tridimensionnelle de plusieurs aspartyles protéases (**Figure 1.2**) a été auparavant mise en évidence grâce au développement de la technique de cristallographie au rayon X. L'étude inclut la pepsine porcine (ABAD-ZAPATERO et al., 1990) ; Cooper et al., 1990), pepsinogène (HARTSUCK et REMINGTON, 1986), penicillopepsine (JAMES et SIELECKI, 1983), endothiapepsine (BLUNDELL et al., 1990), rhizopuspepsine (MILLER et al., 1989 ; WLODAWER et al., 1989), tandis que la Chymosine a été mise en évidence bien auparavant par BUNN et al.(1971). En effet, l'intérêt porté à la structure de la chymosine bovine est ancien. C'est en 1945 que BERRIDGE a publié ses travaux sur la cristallisation de la chymosine à partir de solutions contenant de hautes concentrations en NaCl. Plus tard, BUNN *et al.* (1971) ont caractérisé ces cristaux et ont entrepris la détermination de leurs structures par rayons X. Ce n'est qu'en 1990 que la structure tridimensionnelle de la chymosine bovine recombinante a été résolue et raffinée à 2,3 Å (GILLIGAND *et al.*, 1990). La même année était publiée l'étude cristallographique de la chymosine mutante V111F à une résolution de 2,2 Å (STROP *et al.*, 1990)

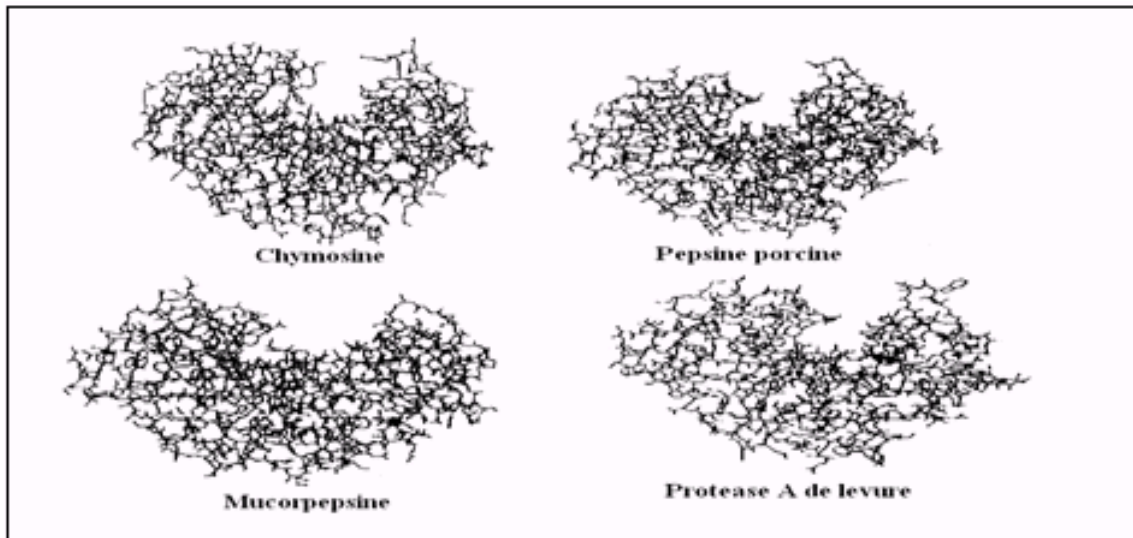


Figure 1.2 : Structure tridimensionnelle et homologie de structure de quelques aspartyl-protéases (**PITTS et al., 1992**)

A partir des connaissances de plus en plus approfondie des caractéristiques biochimiques et des mécanismes d'action, les laboratoires ont développé plusieurs préparations enzymatiques destinées à l'industrie de transformation du lait. En effet, ce sont les enzymes protéolytiques qui ont trouvé le plus d'application en technologie alimentaire et plus particulièrement dans l'industrie laitière où les protéases représentent 60% du marché des enzymes (**RAO et al., 1998**). L'industrie est à présent capable de produire, en quantité pratiquement illimitée, ces succédanés à des prix concurrentiels (**Tableau I.1**), et la fabrication à partir de ces enzymes de différents types de fromages, est déjà réalisée avec plus ou moins de succès.

Tableau I.1 : Principaux producteurs de protéases (**RAO et al., 1998**)

Compagnies	Pays	Commercialisation (%)
Novo Industries Gis – Brocades Genencor International Miles Laboratoires Autres	Danemark Hollande Etats Unis Etats Unis	40 20 10 10 20

Malgré une bibliographie abondante, les caséines du lait principal substrat des protéases coagulantes ont toujours fait l'objet d'étude dans les mécanismes de coagulation lorsqu'il s'agit des applications en fromagerie et l'emploi des succédanés notamment celles d'origine végétale. Il est important de rappeler que les caractéristiques des produits laitiers sont pour une grande part dues aux propriétés de leurs protéines. Les caséines, composant majeur des protéines du lait existent sous forme d'une structure micellaire originale et leurs caractéristiques physico-chimiques les rendent particulièrement sensibles aux protéases. Cet aspect particulier a incité de nombreuses recherches à améliorer leur capacité de valorisation en technologie fromagère et plusieurs types d'enzymes protéolytiques interviennent dans la préparation des produits laitiers. Elles correspondent d'une part aux protéines natives naturellement présentes dans le lait, aux protéines synthétisées par les microorganismes laitiers et d'autre part, aux protéines exogènes - présures et leurs succédanés – ajoutés par la technologie. Bien que les études d'obtention

et de caractérisation des protéases d'origine animale sont connues depuis longtemps (**BOYER , 1971 ; HOFFMAN , 1974**), il demeure néanmoins que des données établies par des études assez récentes montrent la nécessité de la maîtrise des mécanismes d'action et les phénomènes d'interactions enzyme – substrat dans la fabrication des fromages (**FIAT et JOLLES , 1989 ; EL-ELAGAMY , 2000 ; HAYES et al ., 2002 ; O'BRIEN et al ., 2002 ; MOHANTY et al ., 2003**). Cependant, pour certains auteurs, les protéases n'adhèrent pas totalement au système général de la classification de la nomenclature d'enzymes par suite de leur grande diversité d'action et de structure (**BARETT , 1994 ; BARRET , 1995**). En effet, certains chercheurs ont développé en ce qui concerne une nouvelle approche de classification des peptidases (**BARRETT et al ., 2001**). Ces auteurs allèguent que la division des peptidases en seulement 14 sous-sous-classes comme il en est le cas dans la liste « EC » n'est pas adéquate pour un groupe si vaste d'enzymes.

A la lumière de la littérature examinée, un certain nombre de présures de remplacement d'origine animale, végétale ou microbienne ont fait l'objet de recherche et des paradoxes ont été levés aujourd'hui qui ont permis à l'industrie laitière de promouvoir avec la mise sur le marché des laitages d'appellation d'origine (**CHAZARRA et al., 2007 ; SIDRACH et al., 2005 ; SILVA et MALCATA, 2000 ; VERISSIMO et al., 1998**).

La Chymosine

Connue comme l'enzyme de référence par tous les fromagers, elle fait l'objet d'enzyme standard de comparaison dans la presque totalité des travaux menés sur les succédanés de la présure. Majeure composante de la présure, la Chymosine (E.C.3.4.23.4) est sécrétée sous forme de prochymosine inactive. Sous l'action de l'acidité du milieu, elle devient active. Comme la pepsine, la Chymosine est une protéase acide à aspartate. Son poids moléculaire est de 30 700 Da. Selon **FOLTMANN (1979)**, la Chymosine est constituée d'une seule chaîne peptidique renfermant 323 acides aminés. Outre son activité coagulante, spécifique sur la caséine κ , la Chymosine a une activité de protéolyse générale sur toutes les fractions caséiniques. La Chymosine, dont le poids moléculaire est de 35 kDa, est formée d'une chaîne polypeptidique de 323 résidus d'acides aminés. Elle possède trois ponts disulfure dans les positions suivantes: 45 à 50, 206 à 210 et 249 à 282 (numérotation en relation avec la pepsine). Il existe plusieurs formes de Chymosine dans la présure. Les deux formes prédominantes sont la Chymosine A et la Chymosine B, isozymes qui diffèrent par un unique acide aminé dans la position 302 (**FOLTMANN et al. , 1977**). La Chymosine C apparaît comme étant un produit de dégradation de la Chymosine A (**DANLEY et GEOGHEGAN, 1988**).

L'activité optimale de cette enzyme a lieu à pH 5,5 et à une température de 42°C. Elle est stable à pH acide 5,3 et 6,3 et dénaturée à pH 8. Son inactivation thermique, selon **GOURSAUD (1999)**, a lieu dès 50°C et elle est totale à 61°C. La sécrétion de la pepsine (E.C.3.4.23.1), d'après Ramet (1990), ne devient prépondérante qu'une fois la synthèse de la Chymosine est arrêtée. Cette protéase est caractérisée par un poids moléculaire de 33 400 Da. Bien que l'action protéolytique de la pepsine est voisine de celle de la Chymosine ainsi que les fortes homologues de structure que présentent ces deux enzymes, les conditions d'action sont différentes. En effet, selon **MARTIN et al . (1982)** et **GOURSAUD (1999)**, il y a une différence importante en pratique qui consiste en l'influence du pH sur l'activité ; la chymosine est encore active à pH 6,8, alors que la pepsine ne coagule plus le lait au dessus de pH 6,7. La pepsine est relativement stable entre pH 5 et 5,5 et instable à pH 2. En solution, elle est thermosensible après 50°C. D'après **GOURSAUD (1999)**, sa dénaturation thermique a lieu à partir de 70°C.

Choix des succédanés de la présure et état des applications en fromagerie

La forte demande de la présure par les industries fromagères et le prix relativement élevé de ce coagulant ont conduit à l'approvisionnement de plus en plus difficile de la présure traditionnelle. Par ailleurs, dans certains pays, pour des raisons philosophiques ou religieuses, l'utilisation de la présure est interdite. A cet égard, des recherches ont été entreprises, ces dernières années, afin d'exploiter d'autres sources potentielles de coagulases capables de remplacer la présure désignées sous le terme de succédanés de présure (**Tableau I. 3**)

Cependant, un succédané de la présure animale doit présenter une bonne solubilité dans l'eau, un degré de pureté élevé et une activité protéolytique et lipolytique faibles. En plus, il ne doit pas contenir d'enzymes contaminantes (telles les lipases).

Par ailleurs, il doit respecter, selon **RAMET (1990)** et **SMEETS (1995)**, les modalités habituelles du déroulement du processus de la fabrication fromagère. Pour cela, tout succédané de présure doit répondre aux critères suivants :

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

D'un point de vue réglementaire, comme tout additif, l'emploi des enzymes doit être soumis à une réglementation stricte qui permet d'éviter tout risque de toxicité. Selon **NOOR-DEVILLIET et al .(1983)** :

Le milieu de culture utilisé dans le cas des enzymes microbiennes ne doit laisser aucun résidu nocif ou toxique ;

Les microorganismes utilisés doivent être non pathogènes et ne pas produire de toxines ou de substances cancérogènes ;

Les préparations enzymatiques commercialisées ne doivent pas contenir de contaminants microbiens ;

Les agents de stabilisation et de dilution doivent être dans un état d'innocuité ;

Les doses d'utilisation des préparations enzymatiques doivent être respectées afin d'éviter les conséquences dangereuses d'un surdosage.

Par ailleurs, un contrôle de pureté doit être effectué de façon systématique au cours de la production pour les préparations enzymatiques microbiennes.

Tableau I. 3 : Origine de différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait.(MIETTON,1991)

Origine		Enzymes
Animaux	Ruminants Veaux Chevreaux Agneaux Bovins adultes Monogastriques Porcs	Chymosine et pepsine Pepsine Oxysealine Pepsine Pepsine
<i>Végétaux</i>	Figuier (suc) Ananas (tige) Chardon , artichaut Gaillet Courge....	Ficine Broméline Cyprosines, cardosines
Moisissures	Endothia parasitica Mucor pusillus Mucor miehei Aspergillus niger	Protéase Protéase Protéase chymosine « génétique
Levures	Kluyveromyces lactis	chymosine « génétique »
Bactéries	Escherichia coli Bacillus subtilis	Chymosine « génétique » Chymosine « génétique » subtiline « génétique »

Différentes préparations enzymatiques obtenues à partir de certains organes de végétaux sont capable de cailler le lait ; les plus connues sont : la ficine, la papaine, broméline et particulièrement la cardosine . Ces enzymes partagent plusieurs caractéristiques avec la Chymosine, ce sont des aspartic protéases qui hydrolysent la liaison Phe105-Met106 et possèdent un coefficient catalytique (Kcat/Km) similaire vis-à-vis de la caséine κ (MACEDO et al., 1993). Actuellement, ces succédanés font toujours l'objet de travaux (EGITO et al., 2007; TEJADA et al., 2008; CHAZARRA et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2008; LOW et al., 2006). L'utilisation de la fleur de cardon comme agent coagulant a été considérée comme l'un des facteurs déterminants de la qualité des fromages typiques portugais au lait de brebis (SOUSA ET MALCATA,1997 ; AGBOOLA, 2002 ; ZHAO et al ., 2003).

Selon certains auteurs (MACEDO et al ., 1993 ; MARTIN et al ., 1996 ; SILVA et MALCATA, 1998 ; VIOQUE et al ., 2000), l'extrait coagulant du *Cynara cardunculus* présente deux protéases acides aspartiques : la cardosine A, tout comme la chymosine, est responsable de l'activité coagulante et la cardosine B, similaire à la pepsine, est la principale responsable de l'activité protéolytique. Cependant, la fleur de cardon n'est pas utilisée, selon MACEDO et al. (1996), dans la fabrication des fromages au lait de vache vu le goût amer qu'elle lui confère.

D'autres coagulasse ont été étudiées, en l'occurrence, l'extrait du figuier (ONER et AKAR, 1993 ; FADYLOGLU, 2001) et de l'artichaut (LLORENTE et al., 2004).

De nouvelles plantes ont fait l'objet de plusieurs études afin de pouvoir les substituer à la présure animale. En effet, les travaux de KANEDA et TOMINAGA en 1975 ainsi que ceux de UCHIKOBA et al. en 1995 ont porté sur l'extraction et la purification de la Cucumisine (E.C.3.4.21.25), protéase sérine capable de coaguler le lait et extraite à partir de la chair de melon (*Cucumis melo* L var.Prince). Récemment, la lettucine, une protéase coagulante provenant des feuilles de la laitue (*Lactuca sativa* L.), a été purifiée et caractérisée (LO PIERO et PETRONE, 1999 ; LO PIERO et al., 2000).

Cependant, de nombreux coagulants d'origine végétale ont été expérimentés il faut, toutefois, noter qu'ils sont peu utilisés en technologie laitière bien qu'un regain d'intérêt est observe a travers le monde.. Selon GREEN (1977) et LOPEZ et al .,(1996), le pouvoir coagulant très variable de ces extraits ainsi que leurs activité protéolytique très élevée confèrent un goût d'amertume pour le fromage. Ainsi, une utilisation efficace de ces préparations enzymatiques oblige à les employer sous forme purifiée. A ce niveau, ce sont

les laits de brebis (**SALGUERO et al., 1991**; **MACEDO et al., 1996**; **GAYA et al., 1999**; **GALAN et al., 2008**) et de chèvre (**SOUSA et MALCATA, 1997**; **SOUSA et MALCATA, 1999** .) qui sont à la base de plusieurs préparations de fromage.

Dans un autre volet bibliographique, L'appareil digestif de certains mammifères secrète diverses protéases autres que la présure notamment la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine.

En 1929, Northrop parvint à obtenir la pepsine sous forme cristallisée à partir d'extraits de muqueuse gastrique bovine (Quelques années plus tard, HERRIOT, en 1938, entreprit la même démarche sur la pepsine porcine (**MOLL et MOLL, 1998**)). La pepsine porcine devenait la deuxième enzyme gastrique à être obtenue sous forme cristallisée et la quatrième purifiée après l'uréase, la pepsine et la trypsine bovine (**BANGA-MBOKO et al., 2002**). En 1940, NORRIS et ELAM ont pu obtenir une pepsine à l'état cristallisée à partir de la muqueuse stomacale d'un saumon de l'Océan Pacifique (*Onchorhynchus tshawitscha*) (**PERES, 1981** ; **HAARD, 1994**).

La pepsine bovine, selon ANIFANTAKIS et KANDARAKIS (1983), peut substituer, avec succès, la présure habituelle dans la fabrication du fromage Feta. La pepsine porcine, en mélange avec la présure, permet d'obtenir de meilleurs résultats dans la fabrication de fromages acides (RAMET, 1990). L'utilisation de la pepsine du lapin, comme agent susceptible de remplacer la présure, a été rapportée par ABD-EL-RAHMAN et al. en 1990.

Selon **GREEN (1972)**, **GORDIN et ROSENTHAL (1978)**, la pepsine de poulet a été employée comme substitut de présure. Cependant, le fromage Cheddar préparé avec cette protéase pouvait provoquer des défauts dans la saveur. En comparant la pepsine de porc, la pepsine de poulet, la pepsine bovine à la chymosine, **GREEN (1972)** signalait un certain nombre de différences durant la maturation du Cheddar. Cet auteur concluait que la pepsine de poulet n'était pas un bon substitut de la chymosine, provoquant une texture peu satisfaisante et un goût amer des fromages. Selon **FINDLAY et al. (1984)**, La pepsine extraite du proventricule de poulet permettrait la fabrication de Cheddar si la maturation n'excède pas trois mois.

PAEZ DE LEON et al. (1995) avaient entrepris une étude sur une pepsine isolée à partir des estomacs de poulet. Ces auteurs ont utilisé la pepsine de poulet purifiée comme agent coagulant dans la production industrielle de fromages blancs pasteurisés. Par ailleurs, la pepsine du pro ventricule du poulet a été utilisée, selon CUVELLIER (1999), avec succès dans la fabrication de fromages locaux en Israël. Les travaux ont été repris en Turquie avec plus d'intérêt (HASAN TEMIZ, 2009).

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 pro enzymes inactives mêlées à un suc digestif de composition ionique et de pH particuliers (**GUILLAUME, 1999**).

La paroi interne de l'estomac de la morue de l'atlantique secrète une pepsine qui permet de coaguler le lait à 15°C plus efficacement que la chymosine de veau d'où la possibilité, selon **HAARD et al. (1981)**, de contrôler l'activité protéolytique excessive par inactivation thermique. Pour **TAVARES et al. (1997)**, la pepsine extraite de la muqueuse stomacale des poissons constitue un bon substitut de la présure traditionnelle et permet aussi de résorber la pollution provoquée par les industries de transformation. Plusieurs pepsines de poissons, tels que : la sardine (**NODA et MURAKAMI, 1981**), le Capelin (**GILDBERG et RAA, 1983**),

la morue d'Atlantique (**BREWER et al., 1984**), la morue polaire (**ARUNCHALAM et HAARD, 1985**) et le requin (**NUNGARAY et LEGOFFIC, 1996**) ont été purifiées et partiellement caractérisées.

Enfin, une pepsine A a été isolée de la muqueuse gastrique du phoque au Canada et donne de bons résultats dans la fabrication de Cheddar (**SHAMSUZZUMAN et al., 1985 ; TAVARES et al., 1997**). Bien que certains succédanés peuvent être considérés comme produits de remplacement de la présure de veau, il convient, toutefois, de noter que comme l'élaboration de la présure, leur disponibilité reste tributaire du marché de la viande notamment pour les espèces à fort potentiel de transformation.

A la lumière de la littérature examinée, il est important de remarquer que peu d'intérêt est attribué aujourd'hui aux enzymes digestives à des fins de coagulation du lait eu égard aux rares travaux réalisés sur les pepsines extraites des viscères du poulet et du poisson durant ces dernières années.

Dans le volet production fromagère et comme il a été cité plus haut, Parmi les espèces fongiques à pouvoir coagulant, seules trois moisissures sont exploitées par les grandes usines de fermentation en vue de la production de coagulases. Succinctement, l'aspect fermentaire de ces souches est résumé comme suit :

Le *Mucor pusillus* produit une coagulase avec un rendement élevé seulement en culture solide (**AUNSTRUP, 1980**). Les rendements obtenus par **SOMKUTI et BABEL en 1968** sur milieu liquide étaient extrêmement bas. La protéase du *Mucor pusillus* est une protéase acide avec un résidu aspartate au niveau du site actif. Elle est constituée d'une seule chaîne peptidique et son poids moléculaire est d'environ 30 000 Da. Les travaux de **KHAN et al.** en 1983, ont montré l'existence de deux protéases acides et une alcaline dans le mycélium (protéases intracellulaires).

Le *Mucor miehei* est bien adapté à la fermentation submergée. Il secrète une protéase acide à aspartate ayant un poids moléculaire d'environ de 38 000 Da. La coagulase contient une seule chaîne peptidique avec 6 % de carbohydrates.

L'*Endothia parasitica* est cultivée en culture submergée. L'enzyme est beaucoup plus protéolytique que celle du genre *Mucor*. Son poids moléculaire varie entre 34 000 et 39 000 Da. Elle est constituée d'une seule chaîne peptidique. La préparation coagulante est produite par une firme Américaine PFIZER sous la dénomination Suparen.

Des études comparatives réalisées avec certaines présures fongiques et la chymosine ont indiqué de grandes similarités dans le mécanisme de coagulation du lait. En effet, selon **LUQUET (1985)**, les protéases fongiques, contrairement aux protéases bactériennes, ont donné des résultats meilleurs, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure. Cependant, d'après **LEMIEUX ET SIMARD (1991)**, les préparations commerciales contiennent de multiples enzymes protéolytiques et d'autres enzymes qui influent la fabrication du fromage. Ainsi, selon **Sternberg (1976)**, un fromage fabriqué avec la préparation cristalline du *Mucor pusillus* var. Lindt présente un goût moins amer que celui fabriqué avec la préparation brute de la même présure fongique.

Les coagulants du genre *Mucor* ont été largement utilisés dans la fabrication de plusieurs variétés de fromages, bien que de légères modifications dans la technique de la fabrication fromagère sont parfois avérées nécessaires car l'action protéolytique spécifique sur les caséines n'est pas étroitement semblable à la présure. Selon **RAMET (1981)**, des différences sensibles aux variations du pH, de la température et du calcium induisent une rhéologie spécifique du gel durant le caillage et l'égouttage.

L'utilisation de la préparation Noury avec l'addition du CaCl_2 dans la fabrication du fromage Gouda a donné un fromage très semblable à celui fabriqué avec la présure.

Par ailleurs, les travaux de POLYCHRONIADOU ET MANOLKIDIS en 1984 ont montré la bonne aptitude que possèdent les extraits coagulants: Noury rennet, Rennilase et Suparen à la fabrication de fromage de chèvre à croûte fleurie.

Aujourd'hui dans la péninsule ibérique plusieurs fromages dits végétaux sont commercialisés sous la dénomination Appellation d'Origine et fabriqués à base de présure végétale (**SOUSA ET MALCATA, 1997 ; AGBOOLA, 2002 ; ZHAO et al., 2003 ;**).

La préparation Rennilase a été utilisée dans la fabrication des fromages italiens : l'Edam et le Camembert mais avec des rendements légèrement inférieurs à ceux fabriqués avec la présure. En revanche, selon **REPS et al. (1979)**, les propriétés des préparations produites par le *Mucor pusillus*, et surtout celles de la Fromase, sont bien comparables à celles de la présure.

REIGNIER (1980) confirme qu'il est parfaitement possible, grâce à l'utilisation de l'enzyme extraite de *Mucor miehei* (solution Rennilase), de fabriquer, en adaptant les processus technologiques, des fromages d'excellente qualité (**GOURSAUD, 1999**).

Enfin, certains auteurs comme **GREEN et STACKPOOLE (1975)**, **JARMUL et al. (1982)** ont montré l'efficacité d'utiliser une préparation fongique (Noury ou Fromase) en mélange avec la pepsine dans la fabrication de fromage.

Par ailleurs et dans le souci d'améliorer les rendements de production et la réduction de l'activité protéolytique qui affecte la qualité des fromages, des études récentes font toujours l'objet de travaux sur la recherche de nouvelles sources microbiennes (CAVALCANTI et al. 2004; ALAM et al., 2005 ; SILVEIRA et al. 2005 ; CHWEN-JEN SHIEH, 2009 ;)

Il est utile de signaler que grâce au développement du génie génétique, il est actuellement possible de produire de la chymosine à partir de micro-organismes (AIKAWA et al., 1990 ; ALAIS ET LINDEN, 1997 ; COLLIN et al., 1997 ; RAO et al., 1998 ; BELDARRAIN et al., 2000 ; MUNOZ et al., 2004).

La chymosine fermentaire résulte du clonage du gène responsable de la production de la chymosine à partir de l'estomac de veau sur certains micro-organismes ; les plus utilisés sont: *Escherichia coli*, *Klebschmidia fragilis* et *Aspergillus*. Cette méthode constitue l'une des voies porteuses d'espoir pour la synthèse d'enzymes utilisables dans l'industrie laitière. La chymosine produite par les micro-organismes, selon GOURSAUD (1999), a une structure identique à celle synthétisée dans l'estomac du jeune bovidé et fournit les mêmes performances que la présure pure en termes d'activité enzymatique, utilisation et conservation. En effet, la revue de la littérature révèle que depuis les années 80, les techniques d'ingénierie génétique ont été utilisées pour produire de la chymosine bovine recombinante. De nos jours, trois compagnies produisent de la chymosine recombinante à partir de trois différents micro-organismes (tableau I.4).

Tableau I.4 : Formules commerciales chymosine bovine recombinante disponible sur le marché (DA SILVA, 2004)

Microorganisme hôte	Nom du produit commercial	Entreprise
<i>Aspergillus niger</i> var <i>awamori</i>	CHYMOGEN □	Chr-Hansen (Danemark)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	MAXIREN □	Gist-Brocades (France)
<i>Escherichia coli</i> K12	CHY-MAX □	Pfizer (Etats-Unis)

UCHIYAMA et al. (1980) rapportent pour la première fois les résultats de L'isolement de l'ARNm de la prochymosine . Ensuite, proviennent les premières publications sur la production de la chymosine bovine recombinante chez *Escherichia coli* (**NISHIMORI et al ., 1982 et 1984**) qui a été par la suite adoptée par d'autres groupes utilisant *E. coli* (**EMTAGE et al. , 1983 ; MARSTON et al. , 1984**) mais aussi divers micro-organismes dont *Saccharomyces cerevisiae* (**MELLOR et al ., 1983 ; GOFF et al ., 1984**), *Aspergillus spp* (**CULLEN et al ., 1987 ; WARD et al ., 1990 ; DUNN-COLEMAN et al ., 1991 ; TSUCHIYA et al ., 1993**), *Yarrowia lipolytica* (**FRANKE et al ., 1988**), *Proteus mirabilis* (**KLESSEN et al ., 1989**), *Kluyveromyces lactis* (**VAN DEN BERG et al ., 1990**), *Trichoderma reesei* (**HARKKI et al ., 1989 ; UUSITALO et al ., 1991**), *Bacillus subtilis* (**PARENTE et al ., 1991**) et chez des cellules de mammifères (**KOLMER et al ., 1991**). Cependant des restrictions règlementaires freinent l'emploi généralise de la Chymosine transgénique en fromagerie, bien qu'en Algérie son utilisation est actuellement autorisée.

Les substrats des enzymes de remplacement en fromagerie

En plus du caractère intrinsèque des succédanées de la présure, Les protéines sont les constituants les plus recherches du lait. Les facteurs de variation de leur concentration, le polymorphisme génétique des protéines sont autant de facteurs qui déterminent le caractère coagulant des laits (**AULDIST et al., 2002; IKONEN et al, 2004; WEDHOLM et al, 2006**). Elles sont composées de deux grandes familles, les caséines (α S1, α S2, β et κ) qui représentent environ 80 % des protéines vraies, et les protéines solubles, qui sont constituées essentiellement de la β -lactoglobuline, de l' α -lactalbumine, de la sérum albumine et des immunoglobulines. La plupart de ces protéines présentent plusieurs variants génétiques (**GROSCLAUDE, 1988**). Si les protéines solubles du lait ont une valeur nutritionnelle élevée (**ALAIS, 1984**), seules les caséines comptent pour le fromager puisqu'elles déterminent en grande partie le rendement de transformation du lait en fromage (**BARBANO et SHERBON, 1984, ALEANDRI et al . 1990 ; COLIN et al ., 1992 ; HURTAUD et al., 1993**). Ce caractère détermine l'utilisation des présures de remplacement en technologie fromagere et dépendent d'un certain nombre de facteurs lies a leurs potentiels d'utilisation technologique et les aptitudes des différents laits a la coagulation, paramètres qui influent sur la qualité des fromages (**JOHNSON et , 2001; NG-KWAI-HANG et al, 1989**). Par ailleurs, plusieurs autres facteurs agissent sur les mécanismes par lesquels le lait coagule et est tributaire de la qualité de la ration alimentaire des animaux, de l'âge de la période de lactation et des variations saisonnières (**AULDIST et al, 2002; GUINEE et al, 2001; OSTERSEN et al, 1997; TYRISEVA et al, 2004**). En effet et nonobstant l'action spécifique des enzymes sur les différentes formes de caséine, nombre de travaux ont décrits que les propriétés des extraits coagulants affectant la qualité des fromages dépendent grandement de la nature et de la composition des laits (**KALANTZOPOULUS, 1999; RENNER et ABD EL-SALAM, 1991; CHEN et al. 2003 ; TUNICK, 2000 ; SINGH et al., 2003 ; KARAMI et al. 2009**). Ainsi, le facteur espèce animale est prépondérant dans ce cas (**Tableau I. 5**).

Analyses	Type de lait	Résultats	Normes (FAO,1995)
pH	Chèvre	6,60±0.02	6,45-6,60
	Brebis	6,81±0.031	6,50-6,85
Acidité	Chèvre	16,33±0.542	14-18°D
	Brebis	21,83±0.626	22-25°D
Densité	Chèvre	1030,54±0.260	1027-1035
	Brebis	1038,14±0.3	1034-1039
Matière grasse	Chèvre	33,88±0.441	43 g/l
	Brebis	37,56±0.510	75 g/l
Extrait Sec Total	Chèvre	121,17±0.763	136-140 g/l
	Brebis	148,82±0.881	193 g/l
Protéine totale	Chèvre	33,03±0.250	28-35 g/l
	Brebis	56,81±0.289	55,15 g/l
Calcium	Chèvre	1,34±0.085	1,35 mg/l
	Brebis	1,92±0.098	2 mg/l
Phosphore	Chèvre	0,91±0.014	0,92 mg/l
	Brebis	1,21±0.016	1,18 mg/l

Tableau I.5 : Composition moyenne des laits de différentes espèces (PARK et al., 2007)

Par ailleurs, La composition des caséines chez le lait de bovin et des petits ruminants est influence par le polymorphisme génétique des fractions α_1 -, α_2 -, β -, and κ (GROSCLAUDE, 1988). certains variants génétiques des lactoprotéines sont connus pour modifier fortement l'aptitude à la coagulation du lait. C'est le cas en particulier des variants de la caséine kappa. Le polymorphisme des lactoprotéines se traduit aussi par une modification dans la séquence des acides aminés qui peut affecter la cinétique et les produits de protéolyse des caséines et engendrer ainsi des modifications supplémentaires de la texture, de la saveur ou de l'arôme des fromages (MARTIN et al., 2003)

Caséine	Bovine			Ovine			Caprine		
	AA ^a	AA ^b	Sites ^c	AA ^a	AA ^b	Sites ^c	AA ^a	AA ^b	Sites ^c
α_1 -Caséine	199	15	9/9	199	15	10/10	199	15	11/11
α_2 -Caséine	207	15	17/?	208	15	17/13	208	15	16/?
β -Caséine	209	15	6/5	207	15	6/6	207	15	6/6
κ -Caséine	169	21	5/3	171	21	5/3	171	21	6/3

AA - Acides Aminés

^a Nombre de résidus d'acides aminés de la chaîne protéique.

^b Nombre de résidus d'acides aminés du peptide signal

^c Nombre de sites de phosphorylation

Tableau I. 6: Comparaison des caractéristiques structurales des 4 fractions de caséines du lait ovine, ovine et caprin (MARTIN et al., 2003)

En Algérie, la valorisation des laitages traditionnels passe nécessairement par la disponibilité non seulement des succédanés purifiés mais surtout des laits de bovins et des petits ruminants afin de promouvoir la petite industrie laitière vis-à-vis plus particulièrement des coagulases d'origine végétale et a un degré moindre ceux d'origine animal lorsque

leur emploi est envisagée. A cet égard les statistiques sont prometteurs, les travaux de **HACINI (2007)** situent le cheptel bovin a 855.589 têtes, celui des ovins a 10.4777.846 têtes et 2.038.958 têtes pour les caprins pour une production laitière estimée a 1.339 million de litres en 2005 pour les bovins, 494 million de litres pour les ovins et 216 million de litres en 2005 pour les caprins.

Les travaux de la thèse de doctorat d'état que nous nous sommes fixés de réaliser s'insèrent dans l'optique de cette nouvelle approche de recherche avec comme objectif la mise au point et la maîtrise des conditions de purification et de caractérisation des préparations enzymatiques en vue de leurs utilisations en technologie fromagere.

Le document présenté rend compte des résultats de ces travaux menés sur des sous produits de l'industrie agroalimentaire que nous avons juges intéressants en matière de disponibilité et d'économie. Il s'agit des sous produits d'abattage et de transformation générés par les systèmes gastriques du poisson (*Seriola sp*) et du proventricule du poulet (*Gallus gallus*), des systèmes enzymatique extraites de la sève brute du figuier (*Ficus carica L*) et des fleurs d'artichaut (*Cynara scolymus*) et enfin l'isolement de la protéase a partir d'une souche identifiée de *Mucor pusillus*.

L'emploi des succédanés de la présure traditionnelle est pratiquement inconnue chez les industriels de la filière a l'exception des concentras importes pour la production locale de fromage et autres dérivés du lait a base de présure. Ainsi, ceci nous a incite à donner plus de rigueur aux essais de méthodologie (**Tableau I. 8**)pour tenter d'argumenter les raisons motivant le choix de notre protocole expérimental et de confirmer les résultats obtenus à travers le monde. On s'était efforce lors des différents essais , de préciser les conditions d'extraction des enzymes, l'essai variétal, conditions de traitement des substrats, les méthodes de purification....Afin d'obtenir dans les divers essais des résultats qui puissent donner des renseignements les plus utiles non seulement sur l'efficacité de l'utilisation des succédanés mais aussi sur l'étude future de faisabilité technico-economique la plus fiable possible.

Pour toutes ces considérations, l'exécution de des essais de fabrication des fromages ont été souvent menés à l'échelle semi-industrielle avec une certaine latitude avec l'aimable coopération de certaines Laiteries- Fromagerie* , afin de demeurer aussi près que possible de la réalité agro-industrielle

*Laiterie-fromagerie de Boudouaou

Fromagerie LAVALAIT El kseur (Bejaia)

Source d'enzymes	Espèces	Activité (Coagulante + protéolytique)	Application fromagere
Animale	<i>Estomac de Bovin adulte</i>	+++	Pate molle
	<i>Ovin adulte</i>	+++	Pate pressée
	<i>Caprin adulte</i>	+++	Pate pressée
	<i>Proventricule de Poulet</i>	++++	Pate pressée
	<i>Dinde</i>	++++	Pate pressée
Microbienne	<i>Estomac de poissons</i>	+++	Frais
	<i>Mucor pusillus</i>	++	Pate pressée
	<i>Aspergillus niger</i>	+	-
Végétale	<i>Bacillus LC 33</i>	++	-
	<i>Grain de melon</i>	+	Frais
	<i>Citrouille</i>	+	Frais
	<i>Fleurs d'artichaut</i>	++	Pate molle
	<i>Cardon</i>	++	Pate pressée
	<i>Latex de figuier</i>	++++	Frais
Commerciale	<i>Chymosine de veau</i>		
	<i>Aspergillus Niger var. Awamori</i>		

+ Intensité de la Force coagulante des extraits enzymatiques (exprimée en temps de coagulation)

Tableau I.8: Récapitulatif des Essais menés sur les différentes succédanées de la présure traditionnelle dans le cadre du projet de recherche « Recherche de caractérisation des succédanées de la présure traditionnelle » (Projet CNEPRU, Laboratoire de Technologie Alimentaire, INA)

Pour rendre compte des résultats des travaux sur la recherche des succédanés de la présure, L'ensemble de notre travail se découpe en 5 chapitres :

- Le premier chapitre est l'INTRODUCTION.
- Le second chapitre traite d'une protéase extracellulaire obtenue à partir d'une culture en surface de *Mucor pusillus*. Deux protocoles de purification ont été employés et les rendements de purification comparés.
- Le troisième chapitre est consacré à l'étude comparée de deux protéases d'origine animale. Il s'agit des pepsines extraites du système digestif du poulet et du poisson.
- Le quatrième chapitre rapporte les expériences menées sur deux sources potentielles productrices d'enzymes coagulant le lait : La sève brute ou latex du figuier (*Ficus carica*) et les fleurs d'artichaut (*Cynara scolymus*).
- Le cinquième chapitre représente une approche d'analyse sensorielle des fromages fabriqués par les succédanés étudiés comparés à la présure commerciale et les aptitudes à la coagulation de différents laits. Dans ce volet, on s'intéressera aux aptitudes à la coagulation des laits de chèvre et de brebis par des extraits d'origine animale et d'une approche d'analyse sensorielle des fromages fabriqués à partir d'extraits enzymatique d'origine végétale.

CHAPITRE II EXTRACTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA COAGULASE DE *MUCOR PUSILLUS*

INTRODUCTION

Les coagulants d'origine microbienne sont des enzymes protéolytiques produites par des microorganismes capables d'induire la coagulation du lait de manière similaire aux coagulants d'origine animale. Un grand nombre de champignons sécrètent des protéases à acide aspartique dans le milieu de culture, la fonction physiologique de ces enzymes étant l'hydrolyse de protéines pour répondre aux besoins nutritionnels. Les principaux champignons connus depuis longtemps qui sont sources de protéases à acide aspartique, sont *Endothia parasitica* (SARDINAS, 1968), *Rhizopus chinensis* (FUKUMOTO *et al.*, 1967), *Penicillium janthinellum* (HOFMANN et SHAW, 1964), *Mucor pusillus* (ARIMA *et al.*, 1968) et *Mucor miehei* (STERNBERG, 1971). L'industrie fromagère en Algérie reste dépendante en matière d'approvisionnement en agents coagulants vis à vis des laboratoires étrangers et fait recours à l'importation de ces produits en vue de leurs utilisations dans la fabrication de deux types de fromages, principalement le Camembert et l'Edam et quelques dérivés à présure. Pendant la période 1997-2001, l'industrie fromagère a utilisé 4.324 kg de présure et ses concentrés soit un coût de l'ordre de 16 millions de DA (ANONYME, 2002). En 2005, le volume d'importation de présure et de ses concentrés est estimé à 1106 kg pour une valeur estimée à 110 994 dollars US (ANONYME, 2005). Dans le monde, la contrainte de sacrifice des jeunes veaux a créé une situation qui a donné une impulsion aux recherches sur les enzymes de remplacement de la présure (RAMET, 1997). Parmi les voies de substitution, la production d'enzymes coagulantes le lait à partir de la culture microbienne, suscite un intérêt pour la fromagerie locale et dans le monde où plusieurs souches (CORDEIRO *et al.*, 1992) de microorganismes font l'objet de productions industrielles de protéases coagulantes, *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, *Endothia parasitica*, *Irpex lacteus*, *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces lactis* and *Escherichia coli* (OLSON 1995; CHANNE et SHEWALE, 1998). En effet, les coagulants d'origine microbienne sont des enzymes protéolytiques produites par des micro-organismes capables d'induire la coagulation du lait de manière similaire aux coagulants d'origine animale. Un grand nombre de champignons sécrètent des protéases à acide aspartique dans le milieu de culture, la fonction physiologique de ces enzymes étant l'hydrolyse de protéines pour répondre aux besoins nutritionnels. Des études comparatives de ces enzymes coagulantes et de la chymosine ont indiqué de grandes similarités dans le mécanisme de la coagulation du lait et plusieurs variétés de fromages préparées avec ces extraits sont semblables à ceux obtenus avec la présure traditionnelle (DESMAZEAUD et SPINLER, 1997 ; RAMET, 1997 ; GOURSAUD, 1999) . Dans le souci d'améliorer les rendements de production et la réduction de l'activité protéolytique qui affecte la qualité des

fromages, des études récentes font toujours l'objet de travaux sur la recherche de nouvelles sources microbiennes (CAVALCANTI et al. 2004; ALAM et al., 2005). Les mécanismes biochimiques par lesquels ces enzymes sont produites, le processus de purification ont été largement étudiés. Par ailleurs, les aspartyl protéases ont montré une tendance vers l'autoinactivation lors des processus longs de purification (PREETHA et BOOPATHY, 1997). C'est dans cette optique de recherche que l'objectif de notre présente étude vise une meilleure connaissance d'une coagulase fongique issue de *Mucor pusillus* conçue comme une succédanée de la présure utilisée depuis longtemps dans le processus de fabrication des fromages (ARIMA et al., 1968) et ce, à travers l'analyse comparée des rendements enzymatiques obtenus à partir de différents protocoles de purification.

MATERIEL ET METHODE

1- Obtention de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus*

Au cours de notre expérimentation, une souche fongique : *Mucor pusillus* référencée 953771, provenant sous forme lyophilisée du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris – Laboratoire de Cryptogamie – a été utilisée. Un repiquage bimestriel est nécessaire afin de garder la vitalité de la souche. Le milieu de culture utilisé est de type solide (fermentation en surface), préconisé par LEVADOUX et al. (1989). Il est composé de 60 g de son de blé et de 10 ml d'une solution à 0,01 % de sulfate d'ammonium. Après ensemencement des boîtes de pétri contenant le milieu malt gélosé et leur incubation à 37°C pendant 5 jours, les spores sont libérées à l'aide d'une solution à 0,1 % de tween 80. La suspension de spores est filtrée sur de la laine de verre stérile. L'enzyme exo cellulaire est extraite à l'aide d'un tampon phosphate (0,02M, pH6). Dans les travaux antérieurs, l'optimum d'activité coagulante a été déterminé (Figure II.1)

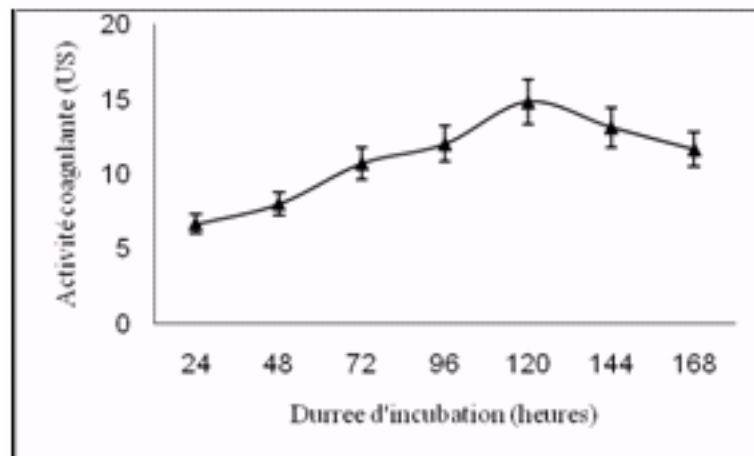


Figure I.1 : Evolution de l'activité coagulante au cours de la croissance de *Mucor pusillus*

Les résultats illustrés par cette figure indiquent que les protéases sont synthétisées dès le début de la croissance pour atteindre un maximum de production au bout de 120 heures (5 jours) de culture, au-delà, on note une baisse de l'activité. Ces résultats (repetables avec une marge d'erreur d'environ 10%) confirment ceux obtenus par ESCOBAR et BARNETT

(1993,1995). KHAN et al .(1979) ont noté une baisse de la production d'enzymes après 116 heures de croissance. TUBESHA et DELAIMY (2003) rapportent une production maximale de l'enzyme coagulante (160 UP) après 4 jours d'incubation a 30°C des spores d'une souche de *Mucor sp.* Auparavant, plusieurs auteurs ont rapporte des observations similaires sur des protéases acides produites par *M. miehei* (4 jours), *M. pusillus* (3 jours) et *M. bacilliformis* (3 a 4 jours) (FERNANDEZ-LAHOORE et al. 1998 ; THAKUR et al. 1990 ; ARIMA et al. 1970)

1. Purification de l'extrait enzymatique

- Traitement des extraits enzymatiques bruts

Afin de pouvoir purifier l'extrait enzymatique coagulant issu de la culture de *Mucor pusillus*, nous nous sommes basés a titre d'étude de comparaison sur deux protocoles de purification afin d'évaluer les rendements obtenus. Le premier selon SOMKUTI et BABEL (1968) qui préconise une échangeuse d'ions suivie d'une gel filtration .Le second, proposé par FERNANDEZ-LAHOORE et al. (1998)inverse les étapes de purification.

- Précipitation au sulfate d'ammonium

L'extrait enzymatique brut est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation. La solution enzymatique ainsi saturée est mise à décanter à + 4°C pendant une nuit. Après centrifugation à 10 000 g pendant 30 mn à + 4°C, le culot est mis en suspension dans le tampon phosphate (0,02 M ; pH 6).

- Dessalage de l'extrait enzymatique

L'élimination du sulfate d'ammonium de l'extrait coagulant est réalisée par le gel filtration sur une colonne Pharmacia (20 x 1 cm) contenant du Sephadex G-25, dont la zone de fractionnement est de 1000 à 5000 Da. Les fractions actives sont rassemblées puis concentrées avec du saccharose.

- Concentration avec le saccharose

Basée sur le principe d'osmose où l'eau migre à travers la membrane semi-perméable, La technique consiste à saupoudrer du saccharose sur le boudin de dialyse placé dans un récipient à + 4°C.

- Techniques de purification

- Chromatographie échangeuse d'anions

Nous avons utilisé l'échangeur Q.E.A.E.(Quaternary-amino-ethyl)- Sephadex A 50, un gel de dextrane sur lequel sont fixés les groupements chargés positivement. Le gel, gonflé dans du tampon phosphate (0,02 M ; pH 6) est dégazé et coulé dans une colonne (1 x 20 cm) équilibrée avec le même tampon. Après concentration de l'extrait, les protéines sont éluées à + 4°C en utilisant un gradient linéaire NaCl de force ionique allant de 0 à 0,5 M préparé dans le même tampon. Le débit d'élution est maintenu constant à 45 ml /heure. La lecture de la densité optique est effectuée à 280 nm. Les fractions présentant une activité coagulante sont rassemblées et dialysées contre le tampon phosphate (0,02 M ; pH 6) durant 16 heures à + 4°C.

- Chromatographie d'exclusion moléculaire

La séparation est réalisée dans un ordre décroissant des poids moléculaires sur le gel Sephadex G-100 a l'aide d'une colonne Pharmacia (1 x 60 cm) calibrée par une solution tampon phosphate (0,02 M ; pH 6). Une quantité aliquote de 1,5 ml d'échantillon est

éluée avec le même tampon à un débit de 2 ml / heure. La lecture des densités optiques est réalisée à 280 nm. Les fractions douées d'une activité coagulante sont rassemblées, concentrées puis conservées.

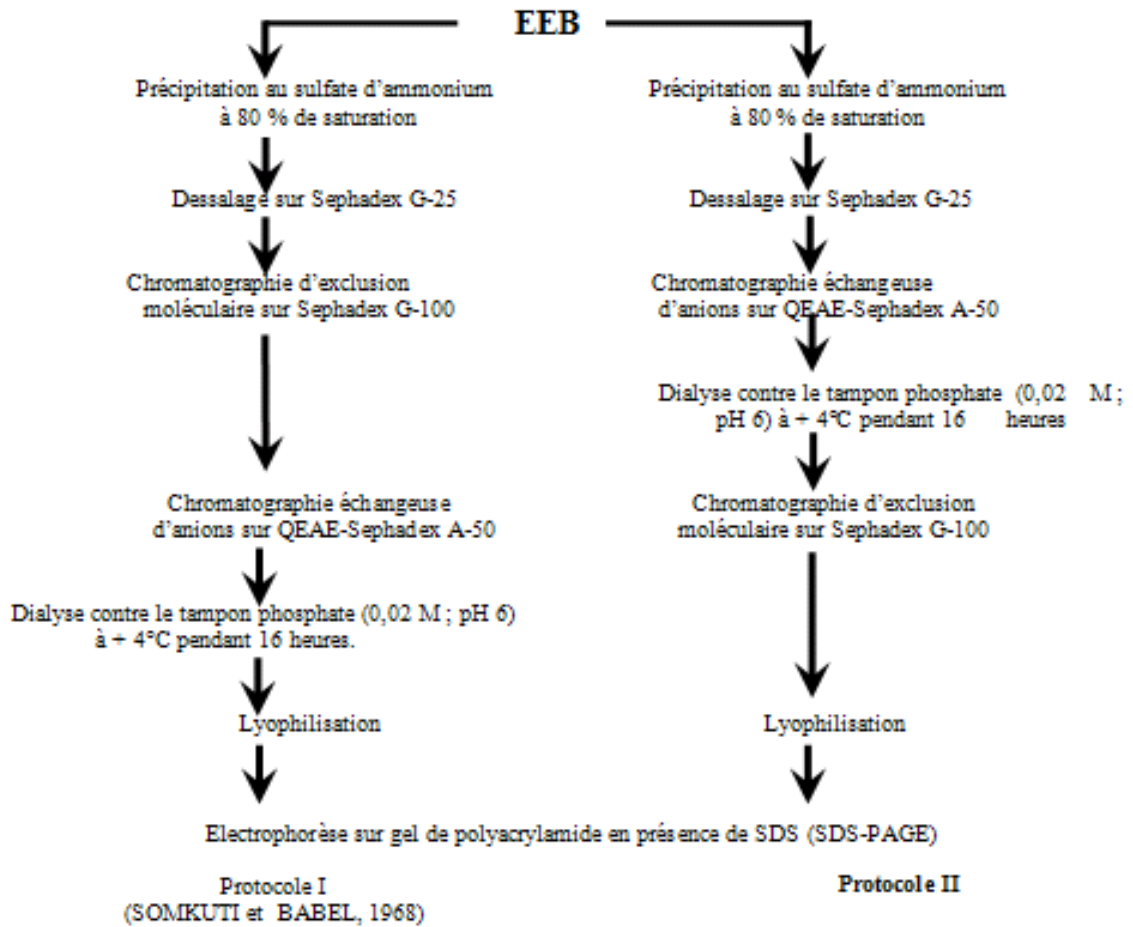


Figure : II.2: Schéma des protocoles suivis au cours de la purification

2- Méthodes analytiques

L'objectif principal de notre étude consiste en la mise en évidence d'un protocole compare de purification. Pour cela, l'extrait enzymatique brut issu de la culture du *Mucor pusillus* subit plusieurs étapes de purification afin d'obtenir une coagulase pure. A cet effet, après chaque étape, l'activité totale de la protéase, la quantité totale de protéine, l'activité spécifique, le rendement en activité et le facteur de purification sont déterminés.

- Mesure de l'activité coagulante

L'activité coagulante est déterminée selon la méthode de **BERRIDGE (1945)** modifiée par **COLLIN et al. (1977)**. Cette méthode permet d'exprimer l'activité de l'extrait enzymatique en unité de présure (UP), qui correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour coaguler 10 ml de substrat standard en 100 secondes à 35°C.

- Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique de l'extrait fongique purifié (récupérés a partir des protocoles 1 et 2) est mesurée selon la méthode de **GREEN et STACKPOOLE (1975)** . Cette activité est déterminée par mesure de la concentration en produits d'hydrolyse de la caséine (casein from bovin milk, Sigma), solubles dans l'acide trichloracétique (TCA à 12 %). Le dosage des peptides solubles est effectué selon la méthode de **LOWRY et al. (1951)**.

· Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants est réalisé selon la méthode de **LOWRY et al. (1951)**. Cette concentration est déterminée à l'aide d'une courbe étalon établie en utilisant le sérum d'albumine bovin (B.S.A. à 200 µg /ml)).

3- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du dodecyl sulfate de sodium (SDS- PAGE)

A chaque étape de purification, un échantillon est conservé à l'état congelé ou lyophilisé en vue d'une électrophorèse (Selon **LAEMMLI, 1970**) dans le but de contrôler l'homogénéité, la pureté de l'enzyme. Les différents échantillons ainsi que les marqueurs, repris volume à volume dans le tampon échantillon sont séparés sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de séparation à 12 % et d'un gel de concentration à 5 %. La migration électrophorétique est réalisée grâce à un système d'électrophorèse « Max Fill Bioblock Scientific » dans les conditions suivantes : Voltage: 250 V, de séparation à 12 % et d'un gel de Ampérage : 74 mA, Temps : 1 heure a 20 c. La révélation des protéines ainsi séparées se fait par la coloration du gel au bleu de Coomassie (R-250) pendant deux heures suivie d'une décoloration jusqu'à apparition nette de bandes.

4- Séquence des acides amines de la protéase

Le séquençage de la protéase coagulante isolée de la souche de *Mucor pusillus* étudiée a été réalisé au niveau du centre de plateforme proteomique du CHU Laval du Québec au Canada.

Digestion en gel des protéines

Les Bandes d'intérêt extraits a partir des gels son places dans 96-puits puis laves avec de l'eau distillée. La digestion enzymatique a la trypsine est réalisée a l'aide d'un MassPrep liquid handling robot (Waters, Milford, USA) selon le protocole décrit par **SHEVCHENKO et al (1996)** avec des modifications suggérées par **HAVLIS et al . BRIEFLY (2003)**. Les protéines sont réduites avec 10mM de DTT et alkyles avec 55mM d'iodoacetamide. La digestion trypsique est réalisée en utilisant 105 mM de trypsine porcine modifiée (Sequencing grade, Promega, Madison, WI) a 58°C pendant 1h. Les produits de la digestion sont extraits a l'aide d'une solution contenant 1% d'acide formique et 2% d'acetonitrile suivie d'une solution a 1% d'acide formique et 50% d'acetonitrile. Les extraits sont concentres sous vide et resuspendus dans 8 µl d'une solution a 0.1% d'acide formique, 4 µl d'extrait sont analyses par Spectrométrie de Masse.

Spectrométrie de masse

Les échantillons de peptides sont séparaes en ligne par Chromatographie Liquide Capillaire nano échelle en Phase inverse ((RP- nanoLC) et analyses par electrospray mass spectrometry (ES MS/MS). Les peptides sont separees a travers une colonne PicoFrit column BioBasic C18, 10 cm x 0.075 mm diamètre interne (New Objective, Woburn, MA) avec un

gradient linéaire composé de 2-50% solvant B (acetonitrile, 0.1% d'acide formique) en 30 minutes, débit de 200 µl/min (obtenu par splitting débit). L'acquisition des spectres de masse est effectuée à l'aide du logiciel (Xcalibur software version 2.0), sur une échelle du spectre comprise entre 400 et 2000 m/z) et analyses à l'aide du logiciel Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.2.0)).

Identification des protéines

Les recherches ont été effectuées dans la banque Uniref14.0_fungi (Plate forme protéomique CHU Laval). Le logiciel Scaffold (version Scaffold-2_01), Proteome Software Inc., Portland, OR) a été utilisé pour valider les spectres MS/MS basés sur l'identification des peptides et protéines. Les identifications sont en ordre de probabilité d'identification. L'identification de protéines par un seul peptide ne doit pas être prise pour acquis. En général, il est nécessaire d'identifier au moins 2 peptides différents (avec des scores de probabilité de 95% et plus pour chacun des peptides) d'une même protéine afin de considérer cette protéine comme étant présente dans l'échantillon. Les protéines identifiées par un seul peptide ou par plus que deux peptides mais avec des scores inférieurs à 95% sont présentes dans la liste des identifications à titre indicatif seulement.

5- Caractérisation de l'extrait coagulant purifié

La caractérisation de l'extrait enzymatique purifié telle préconisée par de nombreux auteurs dans leurs études sur la biochimie des enzymes protéolytiques (**IWASAKI et al. , 1979 ; MASHITA et al. 1994 ; HASHEM 2000 ; MAHESHWARI et al. , 2004 ; CAVALCANTI et al., 2004 ; KUMAR et al. 2005**), consiste en la détermination des conditions optimales de l'activité coagulante en fonction des facteurs liés à l'environnement des propriétés coagulantes des extraits. La mesure de l'activité coagulante est déterminée en mesurant le temps de coagulation selon la méthode citée précédemment (cf. Mesure de l'activité coagulante).

- Détermination de la température optimale d'activité

La température optimale de coagulation du lait a été déterminée en portant le lait à différentes températures de 25°C à 65°C.

- Influence de pH du lait

L'influence de pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique a été déterminée en faisant varier le pH du lait de 5,0 à 7,2.

- Détermination de la concentration optimale de CaCl₂

L'influence de la concentration en CaCl₂ sur l'activité coagulante a été déterminée en faisant varier la concentration du lait en ions CaCl₂ de 0,00 M à 0,05 M.

- Influence de la concentration en extrait enzymatique

Les activités coagulantes ont été déterminées en faisant varier la concentration en protéines de l'extrait de 0,06 mg /ml à 0,3 mg /ml.

- Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique
 - Stabilité thermique

La stabilité thermique de l'extrait a été étudiée en mesurant son activité coagulante résiduelle après maintien de l'extrait enzymatique à des températures variables de 30°C à 60°C pendant 30 mn.

- Stabilité au cours de la conservation

La stabilité de l'extrait coagulant au cours de la conservation à + 4°C et à -18°C a été déterminée en mesurant l'activité coagulante résiduelle de l'extrait.

RESULTATS ET DISCUSSION

1 – Purification de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus*

L'extrait enzymatique brut obtenu à partir de cinq fermentations (soit 300 g de son de blé) est caractérisé, en moyenne, par : une activité coagulante de $0,34 \pm 0,08$ UP /ml, une quantité en protéines de $2,47 \pm 0,13$ mg/ml et Une force coagulante de 1/1200.

1.1 – Protocole I (SOMKUTI et BABEL, 1968)

La précipitation de l'extrait enzymatique brut au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation, a permis d'obtenir une activité de 52,07 % par rapport à l'activité initiale et de multiplier par un facteur de 3,19 l'activité spécifique de la coagulase (**Tableau II.1**). Le profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100 du précipité dessalé et concentré (161,28 mg) révèle deuxpics d'élution (**figure II.3**) dont seul le premier pic est doué d'une activité coagulante. Par ailleurs, une légère augmentation de l'activité spécifique et du facteur de purification a été constatée avec un rendement de 44,54 %. La filtration sur gel a permis d'éliminer environ 94,2 %des protéines non actives.

Les résultats obtenus par **SOMKUTI et BABEL (1968)**, indiquent quatre pics d'élution (dont un seul est actif) après une gel filtration avec l'élimination d'une quantité importante de pigments colorés présente dans l'extrait enzymatique brut avec un facteur de purification deux fois supérieur à celui observé dans notre présente étude. De même, **LENOIR et al. (1979)**, ont pu éliminer 98 % des protéines non actives avec un rendement en activité de 50 %. Le profil chromatographique d'échange d'anions sur QAE- Sephadex A-50 de la fraction active issue de la filtration moléculaire, rapporté par la **figure II.4**, montre trois pics dont un seul est actif. L'enzyme est éluée avec le gradient NaCl à une concentration de 0,35 M. Au cours de cette étape, nous avons enregistré une augmentation du facteur de purification de l'ordre de 17,31. Cependant, le rendement en activité chute à 18,82 %.

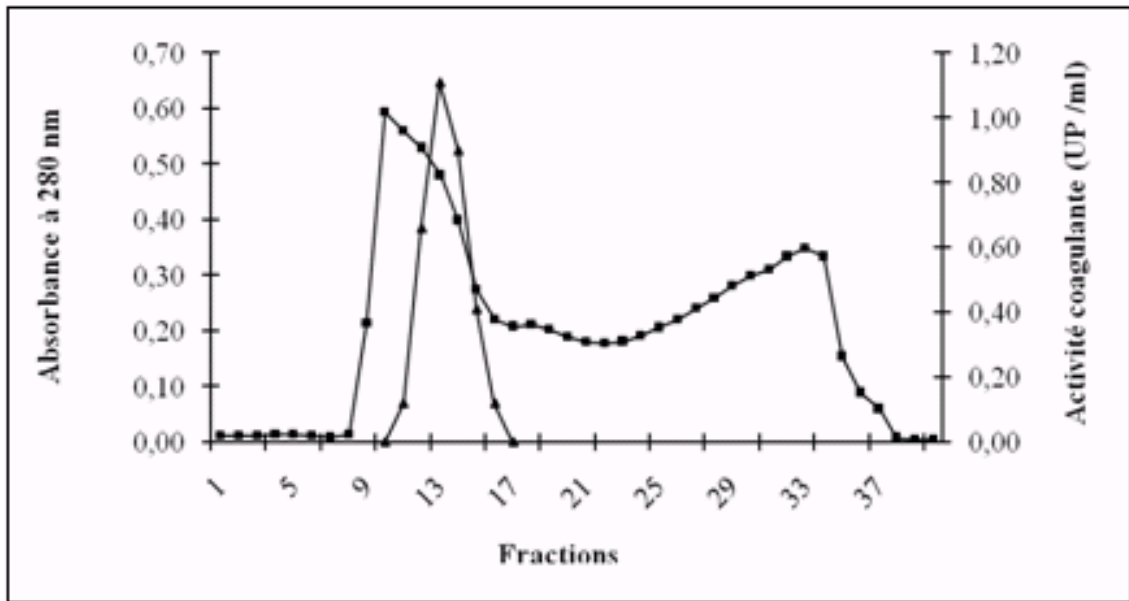
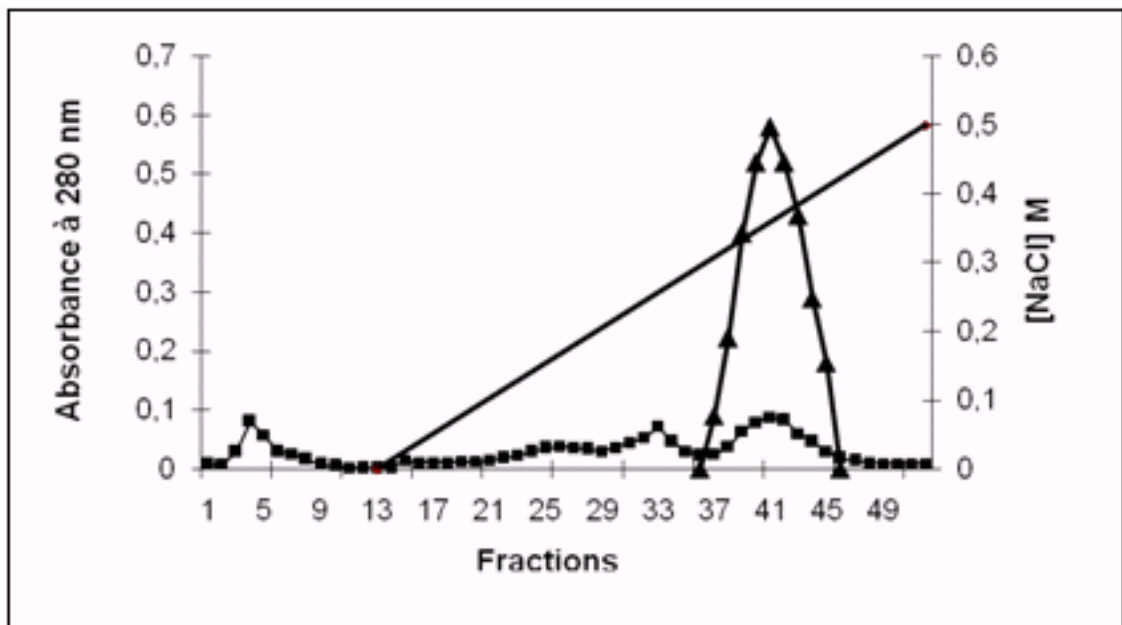


Figure II.3 : Profil d'élution sur Sephadex G-100 de l'extrait enzymatique de *Mucor pusillus* après précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation. (Colonne Pharmacia (1 x 60 cm), tampon d'élution phosphate (0,02 M; pH 6), débit : 6 ml /h, Fraction de 1 ml).



(Absorbance ■, Activité ▲,)

Figure II.4 : Profil d'élution sur QEAE-Sephadex A50 de la fraction active de l'extrait enzymatique de *Mucor pusillus*, issu de la filtration moléculaire. (Colonne (1 x 20 cm), tampon d'élution phosphate (0,02 M ; pH 6), Gradient NaCl 0- 0,5 M, débit : 45 ml /h, Fraction de 2 ml)

Après une échangeuse d'anions, **SOMKUTI et BABEL (1968)**, ont isolé une fraction enzymatique principale pour une concentration en NaCl comprise entre 0,3 et 0,4 M avec un rendement de 55 % et un facteur de purification de 34.

Dans une étude similaire portée sur la purification de la protéase de *Penicillium caseicolum*, **LENOIR et al. (1979)**, ont obtenu un rendement de purification supérieur à 40 % tout en multipliant par un facteur de 29 l'activité spécifique de cette coagulase. En revanche, la purification de la lettucine, menée par **LOPIERO et PETRONE (2002)**, en adoptant une précipitation au sulfate d'ammonium, une filtration sur gel, une échange d'anions puis une seconde filtration sur gel, a conduit à un bilan de purification se traduisant par un rendement de 60 % et un facteur de purification de 5.

Afin de déterminer l'homogénéité de la protéine purifiée, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS est réalisée. Pour cela, plusieurs échantillons ont été utilisés à savoir : l'extrait brut, l'extrait précipité, la fraction active issue de la filtration sur gel et la fraction active issue de l'échangeuse d'anions .

Le profil électrophorétique, illustré par la **figure II.5** confirme l'homogénéité protéique de l'extrait fongique purifié. En effet, on observe une succession de bandes dans le surnageant brut (A) ainsi que dans le précipité au sulfate d'ammonium (B) et une seule bande dans la fraction active issue du Sephadex G-100 (C) et dans la fraction coagulante obtenue sur QEAE- Sephadex A-50 (D).

Les mêmes bandes sont révélées dans le précipité et dans l'extrait brut. Ce qui explique que la précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation avait comme objectif la concentration de l'extrait. De plus, la filtration sur gel après précipitation a permis d'obtenir une bande homogène ce qui nous laisse conclure que l'étape d'échange d'anions n'est pas nécessaire dans notre cas. Par ailleurs, nos résultats concordent avec ceux obtenus par d'autres auteurs (**SOMKUTI et BABEL, 1968 ; LENOIR et al., 1979**), qui ont observé une bande homogène à la fin de la purification.

1.2 – Protocole II (**FERNANDEZ -LAHORE et al., 1998**)

Ce protocole comprend une précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation, une chromatographie échangeuse d'anions et une filtration sur gel. Le profil de la chromatographie sur QEAE- Sephadex A-50 du précipité au sulfate d'ammonium à 80% de saturation (161,28 mg) montre trois pics distincts (**figure II.6**). L'activité coagulante, constatée dans le troisième pic est éluée à une concentration en NaCl de 0,35 M. Cette étape a permis d'obtenir un facteur de purification relativement élevé voisin de 13, cependant, le rendement a chuté à 23,21 % (**tableau II.2**). Selon l'étude de la coagulase de *Mucor pusillus* rapportée par **KHAN et al. (1979)**, l'échange ionique à pH 8 a révélé deux pics correspondant à deux protéases l'une est douée d'une activité coagulante très significative et l'autre présente une très faible activité coagulante avec un rendement de 29 %.

La chromatographie d'exclusion moléculaire de la fraction active a montré deux pics d'élution dont le premier est actif (**figure II.7**). Par ailleurs, un bon facteur de purification (soit de 23) a été obtenu avec une activité spécifique de 3,55. En revanche, le rendement en activité reste très faible (10 %) et seul 0,43 % des protéines totales ont été récupérées. En

Tableau II.1 : Bilan de purification de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus*(Protocole I).

Paramètres de purification	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
E. E. B.	153	988	0,154	100	1
↓ ↓ (NH ₄) ₂ SO ₄ (80% de saturation)	79,68	161,28	0,494	52,07	3,19
Filtration sur gel	68,16	57,6	1,183	44,54	7,68
Echangeuse d'anions	28,8	10,8	2,666	18,82	17,31

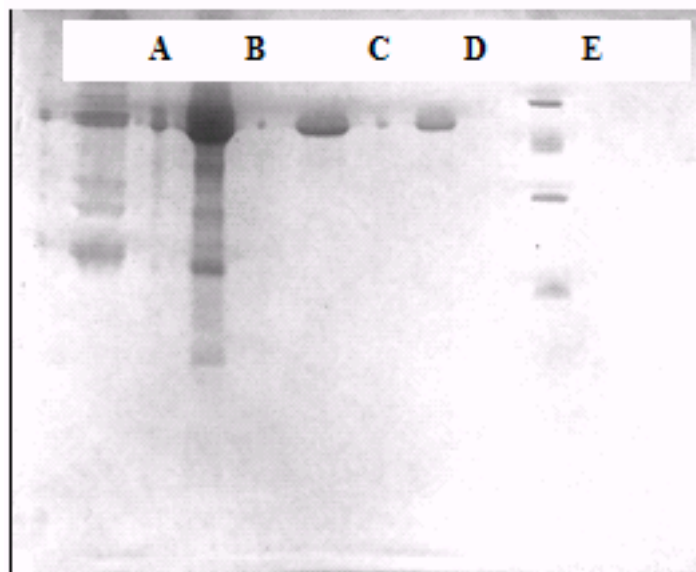
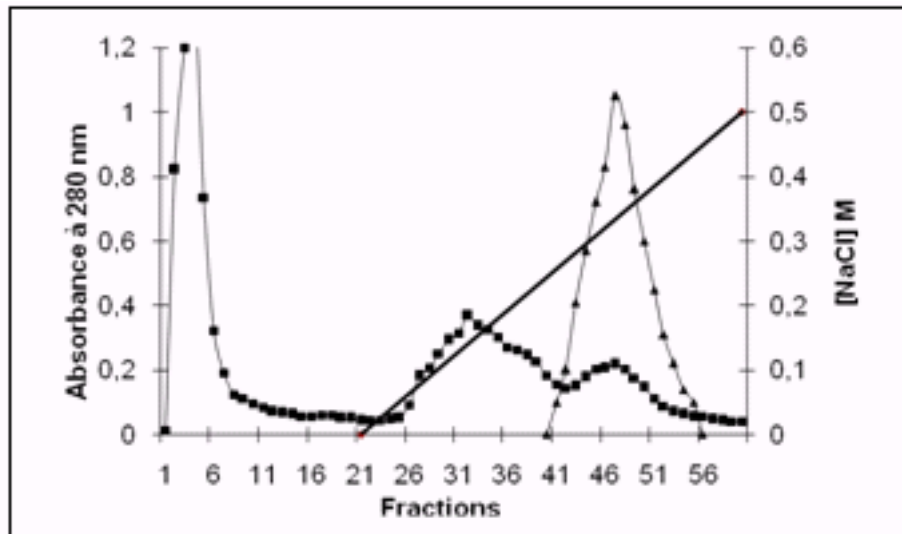


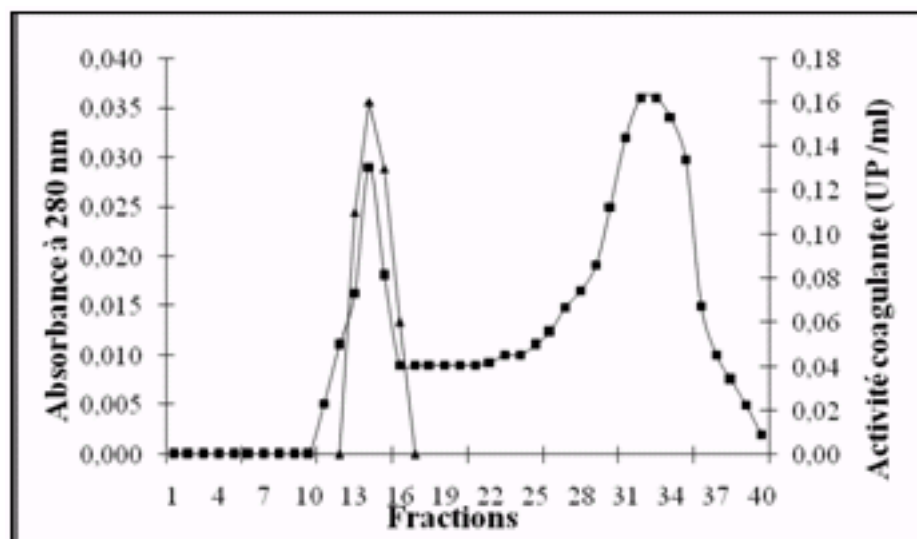
Figure II.5 : Profil électrophorétique des extraits coagulants de *Mucor pusillus* (Protocole I) A – Extrait enzymatique brut, B – Extrait précipité au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation, C – Fraction issue de la filtration sur gel après précipitation au sulfate d'ammonium, D – Fraction coagulante issue de l'échange ionique après gel filtration, E - Protéines marqueurs.

En effet, la filtration sur gel de la fraction active, selon **FERNANDEZ-LAHOIRE et al. (1999)**, a révélé un seul pic actif avec une activité de 76,2 % par rapport à l'initiale. Par ailleurs, la purification de la coagulase du *Mucor bacilliformis* par une ultrafiltration puis une échange d'ions a permis d'obtenir un rendement de 64 % et un facteur de purification de 15,5 (**FERNANDEZ-LAHOIRE et al., 1998**).



(Absorbance ■, Activité ▲, NaCl —)

Figure II.6 : Profil d'éluion sur QEAE- Sephadex A- 50 de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus*, après précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation. (Colonne (1 x 20 cm), tampon d'éluion : phosphate (0,02 M ; pH 6), gradient NaCl : 0-0,5 M, débit : 45 ml /h, fraction : phase 1 : 3 ml, phase 2 : 2 ml)



(Absorbance ■, Activité ▲, NaCl —)

Figure II.7 : Profil d'éluion sur Sephadex G-100 de la fraction active de *Mucor pusillus*, issue de l'échangeuse d'anions. (Colonne Pharmacia (1 x 60 cm), tampon d'éluion : phosphate (0,02 M ; pH 6), débit : 6 ml /h, fraction : 1ml).

Le profil électrophorétique, rapporté par la figure II.8, montre plusieurs bandes dans l'extrait enzymatique brut (A) et dans le précipité (B), une bande dans la fraction active issue de l'échange d'anions (C) et une dans la fraction obtenue par la filtration moléculaire.

Paramètres Etapas de purification	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
E.E.B.	153	988	0,154	100	1
↓↓ (NH ₄) ₂ SO ₄ à 80 % de saturation	79,68	161,28	0,494	52,07	3,19
Echangeuse d'anions	35,52	17,76	2	23,21	12,98
Filtration sur gel	15,36	4,32	3,55	10,03	23,08

Tableau II.2 : Bilan de purification de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus* (Protocole II).

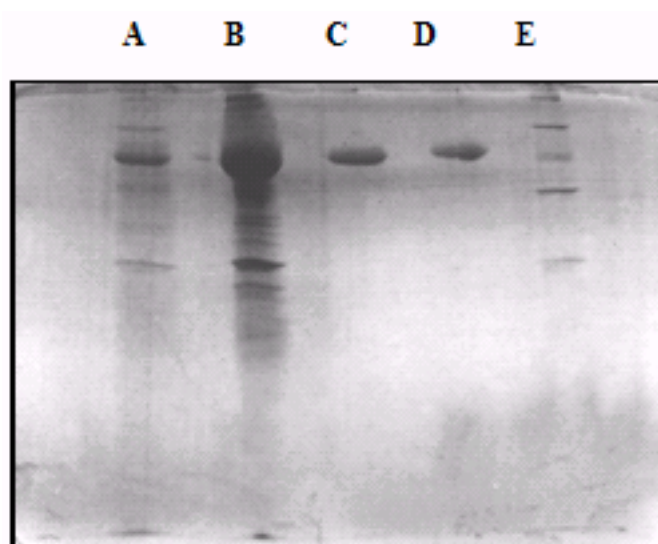


Figure II.8 : Profil électrophorétique des extraits coagulants de *Mucor pusillus* (Protocole II).

A – Extrait enzymatique brut, B – Extrait précipité au sulfate d'ammonium à 80% de saturation, C – Fraction coagulante issue d'échange ionique après précipitation au sulfate d'ammonium, D – Fraction coagulante issue de la filtration sur gel après échange ionique, E – Protéines marqueuses.

Bilan comparatif des protocoles I et II :

En comparant les deux protocoles et en se basant sur les résultats de l'électrophorèse, il ressort qu'une seule technique chromatographique, après précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation, permet d'obtenir une bande homogène. De plus, des bilans de purification il s'avère qu'il est plus intéressant de récupérer une quantité de 6 %

des protéines du départ avec une activité de 44,54 % après gel filtration (protocole I) qui semble techniquement plus rationnelle comparée à l'échangeuse d'ions (1,80 % des protéines totales et un rendement de 23 %) (protocole II). Par ailleurs, l'optimisation d'une méthode de purification est recherchée pour les aspartyl-proteases qui manifestent une autolyse et une autoinactivation rapide (WINE et YADA, 1991 ; PREETHA et BOOPATHY,1997).

1.3- Emploi de la Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

Il est clair que beaucoup de perte d'activité de l'enzyme est enregistrée au cours du processus de purification (**BELYAUSKAITE et al., 1980**). A cet effet, et comme le stipule certains auteurs, une analyse électrophorétique des extraits précipités au sulfate d'ammonium a été réalisée et dont les résultats semblent indiquer que la technique de précipitation fractionnée par ce sel (40 et 80%) s'avère inutile dans nos conditions expérimentales. Bien que ce protocole a permis d'améliorer grandement le facteur de purification mais sans pour autant améliorer le rendement en activité de l'extrait purifié. En effet, les résultats illustrés par le **tableau II.3** montrent une importante chute d'activité de 28,53 % par rapport à l'initiale avec un facteur de purification voisin de 3.

Cette observation ne concorde pas avec celle rapportée par d'autres auteurs qui ont adopté le principe du fractionnement par des sels. En effet, dans une étude similaire portant sur la coagulase de *Bacillus subtilis*, **MATOUB (2000)**, a noté un rendement en activité de 93,75 %. Par ailleurs, **CAVALCANTI et al. (2004)**, en fractionnant l'extrait brut d'une coagulase fongique issue de *Nocardiaopsis sp.* ont observé un rendement de 55 % et un facteur de purification de 7. La précipitation de l'extrait de *Rhizopus oryzae* a conduit à un rendement de 103 % ce qui est due, selon **KUMAR et al. (2005)**, à l'élimination des substances inhibitrices présentes dans la préparation enzymatique brute.

Le profil chromatographique sur Sephadex G-100 du précipité fractionné au sulfate d'ammonium, rapporté par la **figure II.9**, révèle un seul pic doué d'une activité coagulante. Cette étape a permis de multiplier par un facteur de 18,30 l'activité spécifique de la coagulase (**tableau II.3**). Cependant, le rendement en activité reste encore faible soit de l'ordre de 20,51 %.

Les travaux de **KHAN et al. (1979)**, ont conclu que la précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (50 – 80 % de solution) suivie d'une échangeuse d'anions à pH 6 a permis de séparer la protéase coagulante de la protéase non spécifique avec un rendement de 64 % et un facteur de purification de 29. Cette séparation n'a pas été réalisée par ces mêmes auteurs en précipitant l'extrait brut à 80 % (soit un rendement de 33 %) suivie d'une échange ionique à pH 8 (soit un rendement de 29 %).

La **figure II.10** rapporte que la fraction active issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire (après fractionnement au sulfate d'ammonium) est homogène. Ce résultat est noté par plusieurs auteurs (**KHAN et al., 1979 ; CAVALCANTI et al. , 2004 ; KUMAR et al. , 2005**). Par ailleurs, le profil électrophorétique de l'extrait enzymatique brut, du précipité par fractionnement (40 – 80 %) et du précipité à 80 % de saturation ne montre aucune différence entre ces trois échantillons (**figure II.11**).

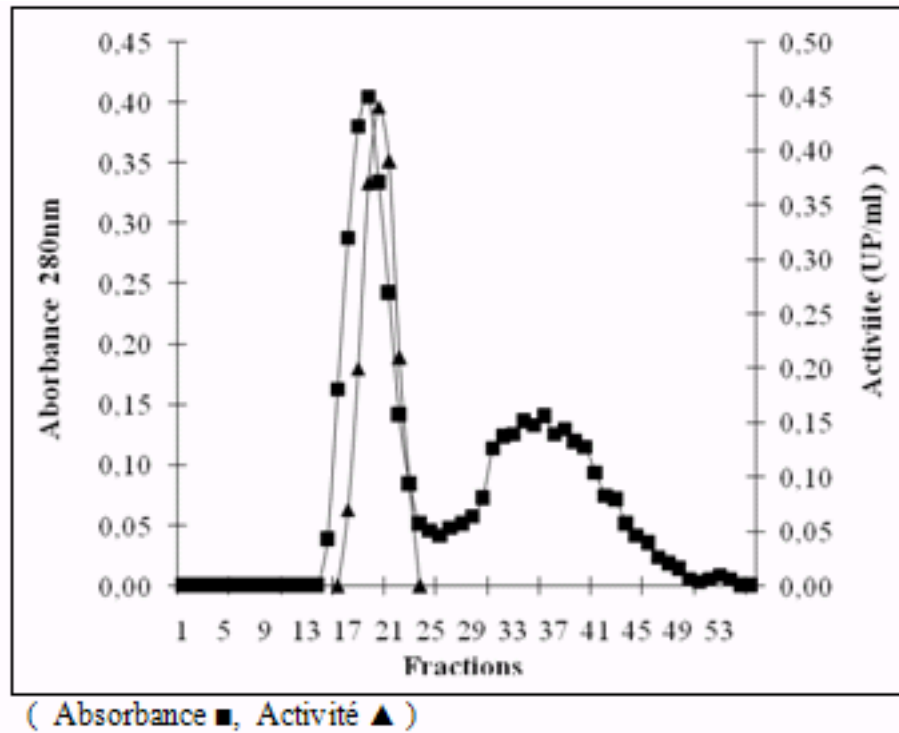


Figure II.9: Profil d'éluion sur Sephadex G-100 de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus*, précipité par fractionnement au sulfate d'ammonium (40-80% de saturation). (Colonne Pharmacia (1 x 60 cm), tampon d'éluion : phosphate (0,02 M; pH 6), débit : 6 ml /h, fraction de 1 ml).

Tableau II.3 : Bilan de purification de l'extrait coagulant de *Mucor pusillus* après précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium).

Paramètres Etapes de purification	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
E.E.B.	117	1012,5	0,115	100	1
↓ ↓ (NH ₄) ₂ SO ₄ (40 – 80% de saturation)	39,96	140,04	0,341	28,53	2,96
Filtration sur gel	24	11,4	2,105	20,51	18,30

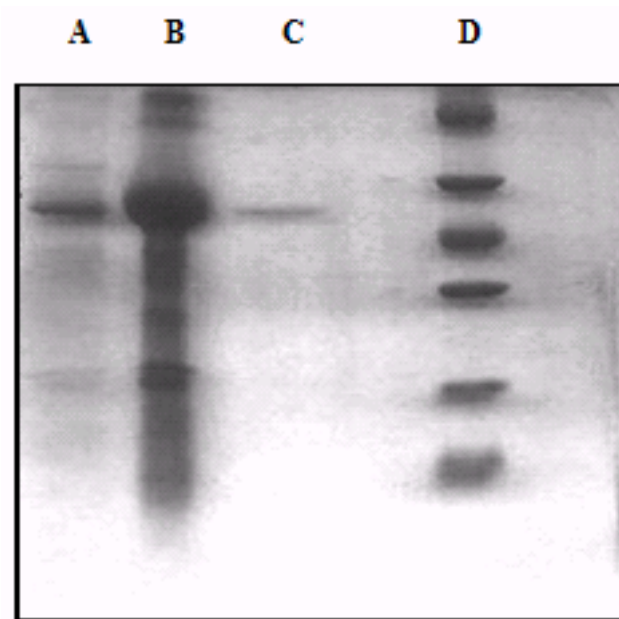


Figure II.10 : Profil électrophorétique des extraits coagulants de *Mucor pusillus* Ligne A : Extrait brut, Ligne B: Précipité (40 – 80 %), Ligne C : Extrait purifié sur G-100 du précipité 40-80%, Ligne D: Protéines standards)

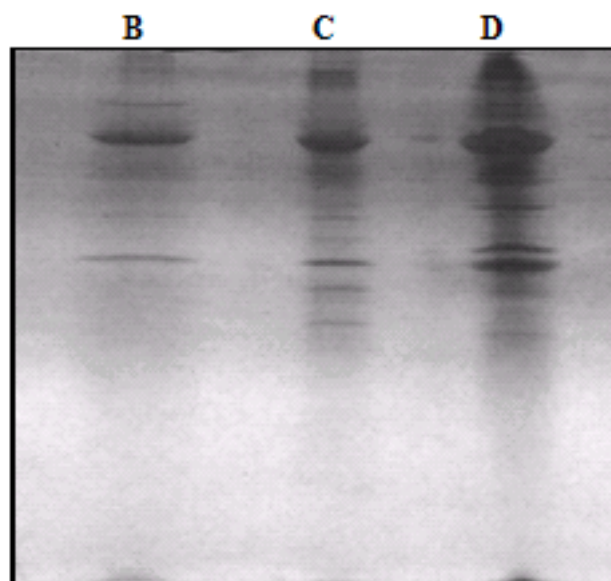


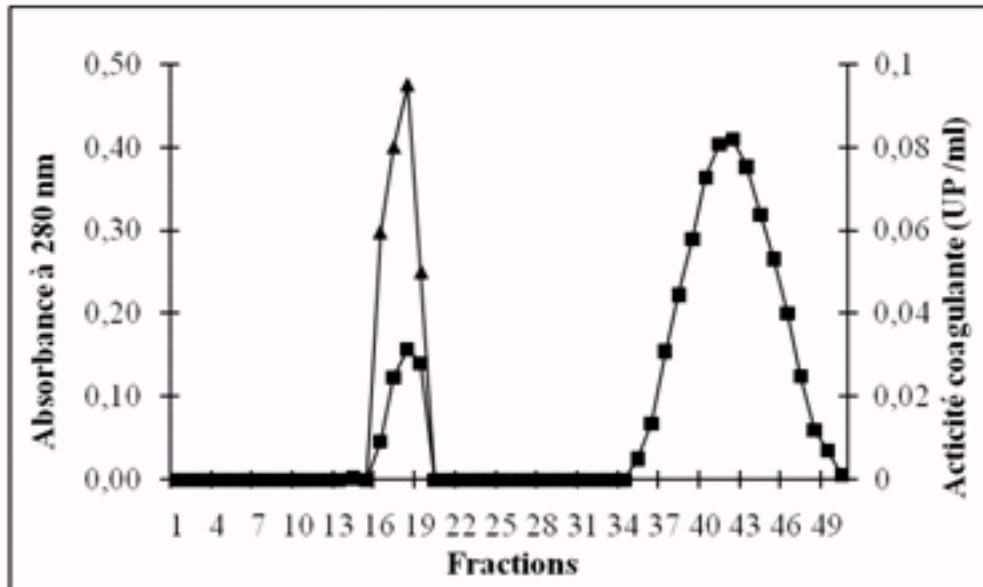
Figure II.11 : Profil électrophorétique des extraits coagulants de *Mucor pusillus* Ligne A : Extrait brut, Ligne B: Précipité (40 – 80 %), Ligne C : Précipité 80%).

Afin de justifier nos observations portées sur la performance du protocole I et l'intérêt de la gel filtration (**Figure II.12**), les extraits enzymatiques bruts sans l'emploi de la précipitation au sulfate d'ammonium ont été lyophilisés et soumis respectivement à une chromatographie d'exclusion (**Figure II.13**) et à une échangeuse d'ions (**Figure II.14**). Les résultats du **tableau II.4** montre que la gel filtration a permis d'éliminer environ 97 % des protéines non actives et d'améliorer le rendement en activité de 55,13 % tout en multipliant

par un facteur de 20,88 l'activité spécifique de la coagulase contre un facteur de purification de 6,75 avec l'échange ionique (**Tableau II.5**) avec apparition d'un peptide

d'environ 20 kDa après électrophorèse (**Figure II.15**). En revanche, la filtration moléculaire a permis d'éliminer cette bande, et donne de ce fait une seule bande homogène (**Figure II.16**).

Dans ces conditions, **ARCESES (1992)** et **POZA et al. (2003)** ont observé une hétérogénéité protéique des extraits purifiés par échange d'ions respectivement de *Rhizomucor miehei* et *Myxococcus xanthus* strain 422.

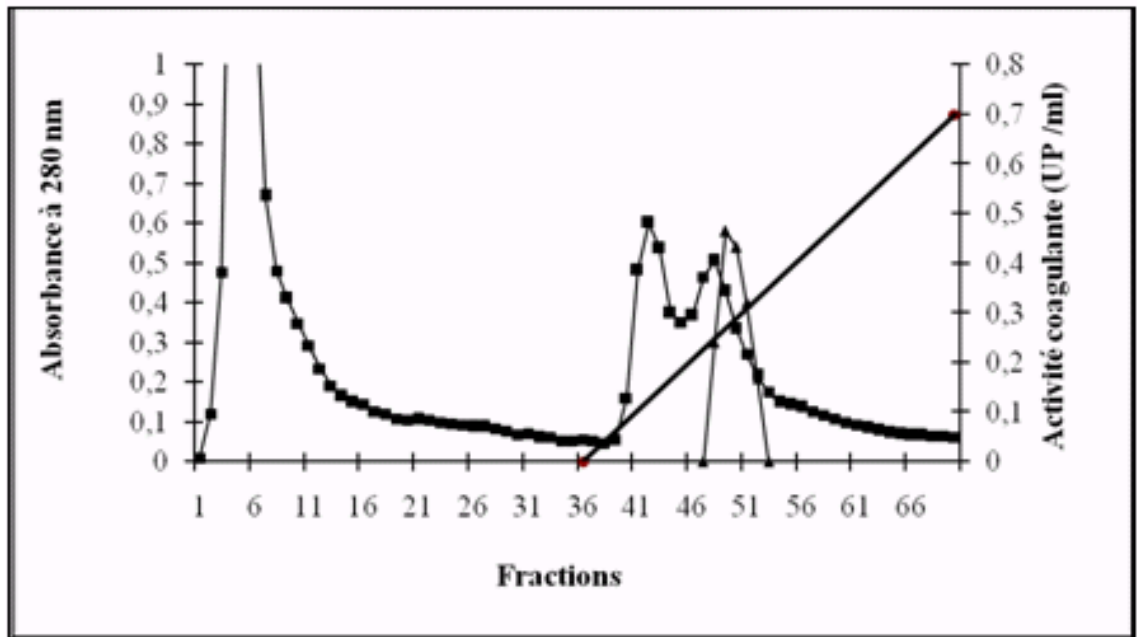


(Absorbance ■, Activité ▲.)

Figure II.12: Profil d'élution sur Sephadex G-100 de l'extrait coagulant brut lyophilisé de *Mucor pusillus* Colonne Pharmacia (1 x 60 cm), tampon d'élution : phosphate (0,02 M ; pH 6), débit : 6 ml /h, fraction : 1 ml).

Tableau II.4: Bilan de purification de l'extrait brut lyophilisé de *Mucor pusillus* (filtration sur gel).

Paramètres Etapes de purification	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP / mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
E.E.B. lyophilisé	27,75	125	0,222	100	1
Filtration sur gel	15,30	3,30	4,636	55,13	20,88



(Absorbance ■, Activité ▲, NaCl —)

Figure II.13 : Profil d'éluion sur QEAE- Sephadex A-50 de l'extrait brut lyophilisé de *Mucor pusillus* (Colonne (1 x 20 cm), tampon d'éluion : phosphate (0,02 M ; pH 6), gradient NaCl : 0 – 0,7 M, débit : 45 ml /h, fraction : 3 ml).

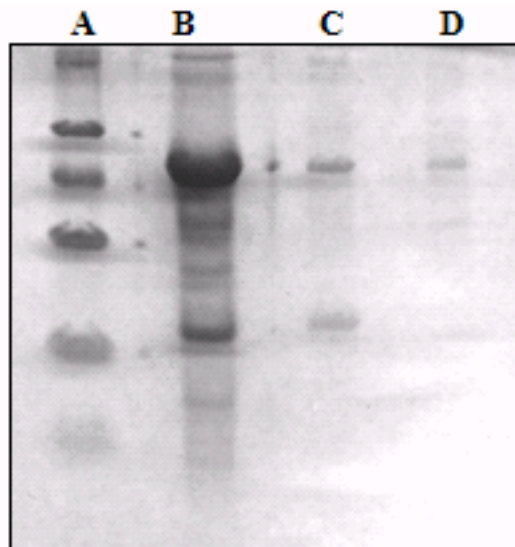
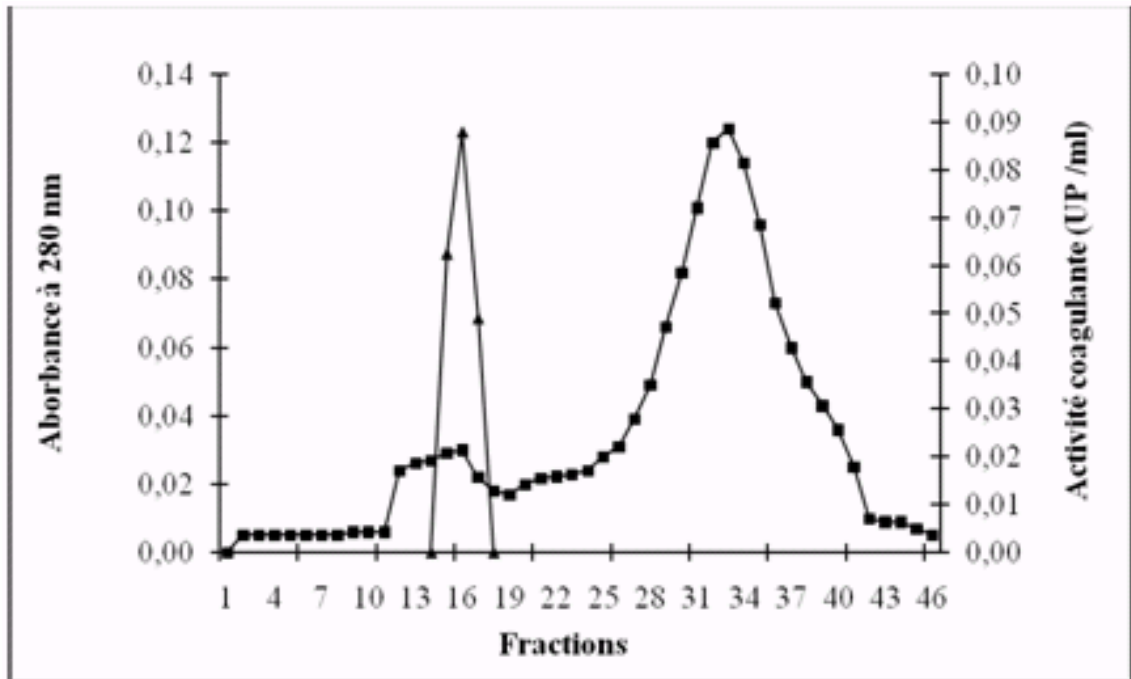


Figure II.14 : Profil électrophorétique des extraits coagulants de *Mucor pusillus* (B -extrait brut lyophilisé, C -Fraction active issue de l'échangeuse d'anions, D - Fraction active issue de la filtration sur gel).



(Absorbance ■, Activité ▲.)

Figure 11.15 : Profil d'élution sur Sephadex G-100 de la fraction active issue de la chromatographie échangeuse d'anions de l'extrait brut lyophilisé de *Mucor pusillus*.)

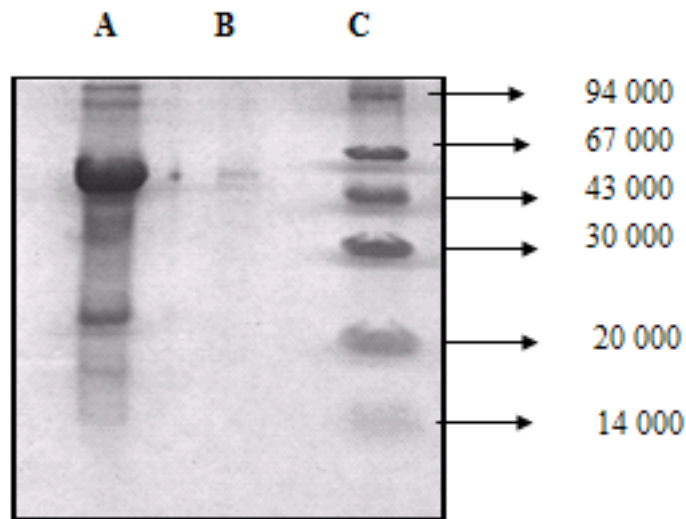


Figure II.16 : Profil electrophoretique des extraits de *Mucor pusillus* (A- extrait brut Lyophilisé, B-fraction active issue de la filtration sur gel).

Paramètres Étapes de purification	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
E.E.B. lyophilisé	27,75	125	0,222	100	1
Echange d'anions	16,5	11	1,5	59,45	6,75
Filtration sur gel	2,1	0,525	4	7,56	18,01

Tableau II.5 : Bilan de purification de l'extrait brut lyophilisé de *Mucor pusillus*.

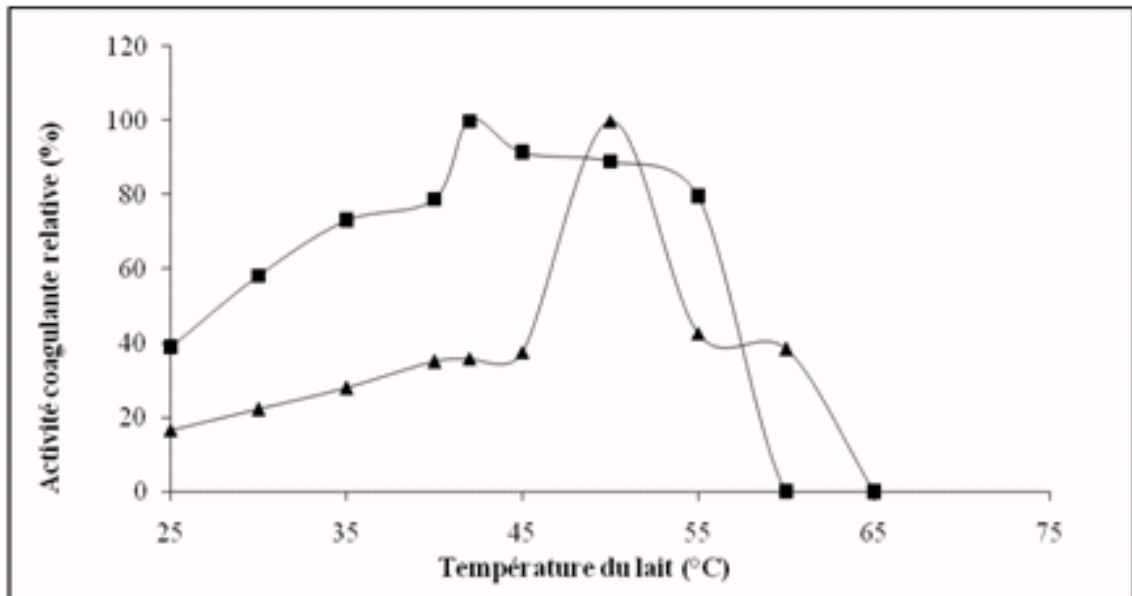
2– Caractérisation de l'extrait fongique purifié et de la présure

Influence de la température

La détermination de la température optimale d'activité des préparations coagulantes a été réalisée en mesurant le temps de coagulation à différentes températures du lait allant de 25°C à 65°C. **La figure 17**, rapporte un comportement différent des enzymes étudiées. L'optimum d'action pour la coagulase purifiée du *Mucor pusillus* et de la présure animale est, respectivement, obtenu aux températures du lait égales à 50°C et 42°C. Au delà de ces températures, on note une baisse d'activité pour les deux coagulases. Par ailleurs, l'extrait coagulant fongique, comparé à la présure animale, se montre encore actif à 60°C. A cette température, la présure est complètement détruite.

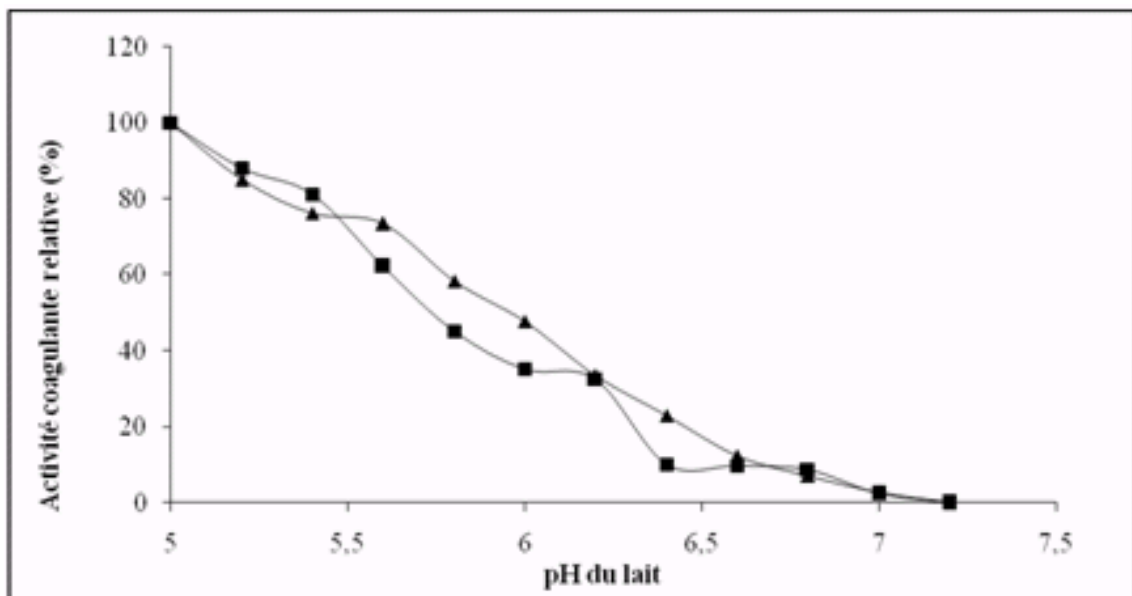
L'influence de la température sur le temps de prise résulte de trois effets : la thermosensibilité de l'enzyme coagulante (la présure commence à se dénaturer à 35°C et est totalement dénaturée à 65°C), la vitesse de la réaction enzymatique (phase primaire : $Q_{10} = 2$) et surtout la vitesse d'agrégation (phase secondaire : $Q_{10} = 12$) (**MIETTON et al, 1994**).

Selon **GARNOT et MARTIN (1980)**, la présure présente une activité coagulante optimale à une température voisine de 40°C. Les études portant sur la coagulase de *Mucor pusillus* ont rapporté un optimum thermique de 55°C (**SOMKUTI et BABEL, 1968 ; IWASAKI et al. , 1979 ; MAHESHWARI et al. , 2004**). Ce même résultat a été obtenu par **CAVALCANTI et al. (2004)** pour la protéase coagulante de *Nocardopsis sp.* Par ailleurs, l'enzyme sécrétée par *Rhizopus oryzae*, présente, selon **KUMAR et al. (2005)**, un optimum thermique de 60°C, température optimale d'action des enzymes de *Bacillus* (**MADSEN et QVIST, 1997 ; MATOUB, 2000**). **GOURSAUD (1999)**, a observé une température optimale d'action de 52°C à 62°C pour les préparations fongiques coagulantes de



Presure ■, *Mucor pusillus* ▲.

Figure II.17 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié de *Mucorpusillus*.



Presure ■, *Mucor pusillus* ▲.

Figure II.18 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié de *Mucorpusillus*.

Mucor miehei, *Mucor pusillus* et *Endothia parasitica*.. Bien que possédant des propriétés coagulantes reconnues en fromagerie, la thermostabilité de *Mucor pusillus* a toujours fait l'objet de travaux dans le but de produire des mutants moins thermostables (YAMASHITA et al. 1994).

Compares aux succédanées d'origine animales et végétales, les activités catalytiques de ces enzymes sont observées à des optimums thermiques très différents, supérieures à

50°C pour les extraits végétaux (**ONER et AKAR, 1993 ; BASHIR et al. 1996 ; SILVA et MALCATA, 2000 ; EGITO et al. 2007**) et des optimum compris entre 30 à 40°C pour les pepsines animales d'origine aquatique (**GUERARD, 1987 ; GUERARD et LEGAL, 1989 ; TAVARES et al. 1997 ; AMIZA et al. 2000**) et celles provenant des proventricules de poulet (**GORDIN et ROSENTHAL 1978 ; PAEZ DE LEON et al. 1995**).

La température est en général plus élevée pour les enzymes de microorganismes (ESAWY et al. 2006) et de végétaux par comparaison aux protéases animales. De telles enzymes sont, selon **ALAIS (1984)**, favorisées. En effet, l'avantage de ces enzymes réside en leur capacité d'activer le processus technologique de fabrication de fromages, dans le cas où la coagulation nécessiterait des températures élevées, juste après la pasteurisation où l'on fixe des valeurs de températures supérieures à 50°C.

Influence de pH du lait

L'effet du pH du lait sur l'activité coagulante est illustré par la figure II.18. Les deux préparations enzymatiques étudiées présentent un comportement analogue vis à vis du pH du lait. Une activité relativement importante est constatée à pH 5 ; au delà de cette valeur, l'activité diminue. A pH 7, l'activité de la coagulase fongique étudiée et de la présure animale, ne représente que 2,65 % et 2,4 % respectivement. Ces deux préparations sont complètement inactivées à pH 7,2.

L'abaissement du pH de 7 à 5,2 provoque la diminution du temps de coagulation (**RAMET, 1990 ; NAJERA et al. , 2003**). En effet, l'acidification du lait favorise la réaction d'agrégation par suite à la diminution de la stabilité des micelles, liée à la neutralisation des charges négatives et à la libération d'ions calcium.

Selon **IWASAKI et al. (1979)**, le pH optimum de la coagulase du *Mucor pusillus* est de 3,5 en utilisant de la caséine comme substrat. La même constatation a été rapportée par **BELYAUSKAITE et al. (1980)** pour la protéase du *Mucor renninus* testée sur de l'hémoglobine.

Cependant, les travaux de **SOMKUTI ET BABEL (1968)** puis ceux de **KHAN et al. (1979)** ont rapporté un pH optimum de 3,8. Les enzymes fongiques, selon **FERNANDEZ-LAHOURE et al. (1999)**, se caractérisent par un pH optimum d'action entre 2,5 et 5,5. En revanche, l'optimum d'hydrolyse de la caséine par la chymosine est compris, selon **MIETTON et al. (1994)**, entre pH 5,4 et pH 5,7 tandis qu'il se situe entre 2 et 3 pour la pepsine. Par ailleurs, la pepsine de poisson (*Munida*) a une activité optimale entre pH 6,5 et 7,5 (**D'AMBROSIO et al. , 2003**). **GARNOT et MARTIN (1980)** ont rapporté un pH optimum de 5,8 pour la présure animale. **CHANNE et SHEWALE (1996)** observent un optimum de 5,6-5,8 pour *Aspergillus niger* MC4. Par contre, **ESAWY et al. (2006)** rapportent une activité coagulante maximale à pH 7 pour *Bacillus licheniformis*, tandis que **CHWEN-JEN SHIEH A et al. (2009)** rapportent que les extraits coagulants de *Bacillus subtilis natto* possèdent des propriétés similaires à la Chymosine et la présure de *Mucor*.

Par ailleurs, l'activité optimale de la coagulase extraite à partir de l'artichaut se situe entre pH 4,5 et 5,5 (**LLORENTE et al. , 2004**), par contre, celle de la broméline est de 8,5 (**BRUNO et al. , 2002**).

En définitif, l'effet du pH du lait sur l'activité coagulante des enzymes est fortement dépendant de leur origine et de la nature du substrat

Influence de la concentration en CaCl₂

L'influence du calcium sur l'activité coagulante de la protéase du *Mucor pusillus* comparée à la présure animale, a été étudiée en faisant varier sa concentration dans le lait de 0,00 M à 0,05 M.

Les résultats indiqués par la **figure II.19** montrent que l'activité coagulante augmente avec la concentration en CaCl₂ du lait. L'optimum d'activité pour les deux préparations coagulantes est obtenu pour une concentration de 0,02 M. Au delà, l'activité baisse par un effet inhibiteur de l'ion calcium. Cet effet est plus marqué avec l'extrait coagulant purifié de *Mucor pusillus*.

L'addition du calcium soluble entraîne une augmentation de la teneur en phosphate de calcium colloïdal lequel semble être le facteur déterminant de l'aptitude du lait à la coagulation par la présure (**BRULE et LENOIR, 1990**). En effet, Cette addition provoque, selon **NAJERA et al. (2003)**, une diminution du temps de coagulation. Cependant, pour une concentration élevée en CaCl₂, le temps de coagulation tend à augmenter.

D'après les résultats obtenus par **PREETHA ET BOOPATHY (1997)**, aucune différence de sensibilité de la protéase commerciale de *Rhizomucor miehei* par rapport à la présure n'a été constatée. Par contre, Les travaux de **KUMAR et al. (2005)** montrent que l'addition des ions calcium provoque une augmentation de l'activité coagulante de 250 % et des résultats similaires ont été rapportés sur les protéases de *Irpex lacteus* (**KAWAI, 1971**), de *C. albidus* (**ALESSANDRO et FEDERICO, 1999**), de *Rhizomucor miehei* (mutant NRRL 3500) (**PREETHA et BOOPATHY, 1997**) et de *P. oxalicum* (**HASHEM, 2000**)..

Par comparaison à la présure animale, les enzymes de *Mucor* sont très sensibles aux variations de la teneur en calcium (**IWASAKI et al, 1979 ; ANSTRUP, 1980**).

Pour **CASTILLO et al. (2002)**, l'addition de CaCl₂ est un facteur déterminant dans l'évaluation du temps de prise et la qualité du coagulum préparé à base de chymosine et d'une protéase de *Mucor miehei* . **LAGOUEYTE et al. (1995)**, **ERDEM (1997)**, **PASSOS et al. (1999)** observent des variations dans la prise du gel, le temps de coupe ou T_{cut} (en anglais) et la durée d'hydrolyse de la caséine κ. à différents niveaux d'addition du chlorure de calcium.

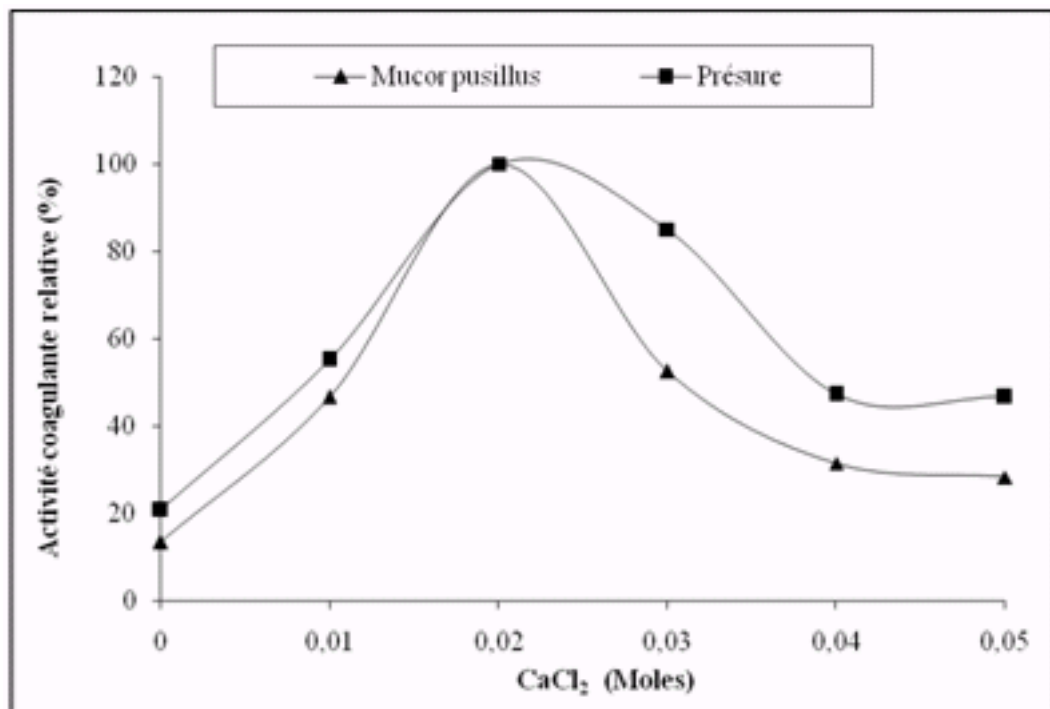


Figure II.19 : Effet de la concentration en CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié de *Mucorpusillus*.

Influence de la concentration en extrait enzymatique

L'activité des extraits coagulants, en fonction de la concentration en extrait, a été estimée en mesurant le temps de coagulation pour des concentrations variables de 0,06 mg /ml à 0,3 mg /ml.

Les résultats rapportés par la **figure II.20** montrent que l'activité coagulante des deux extraits augmente quand la concentration en enzyme augmente. Cependant, dans l'intervalle des concentrations allant de 0,25 à 0,3 mg /ml, on note un palier de saturation en enzyme et ce pour la coagulase fongique contrairement à la présure animale. Toutefois, **GARNOT ET MARTIN (1980)** et plus tard **GOURSAUD (1999)**, ont montré que l'activité coagulante de la présure croît linéairement en fonction de la concentration en enzyme, lorsque celle-ci est faible ce qui correspond aux doses employées en fromagerie.

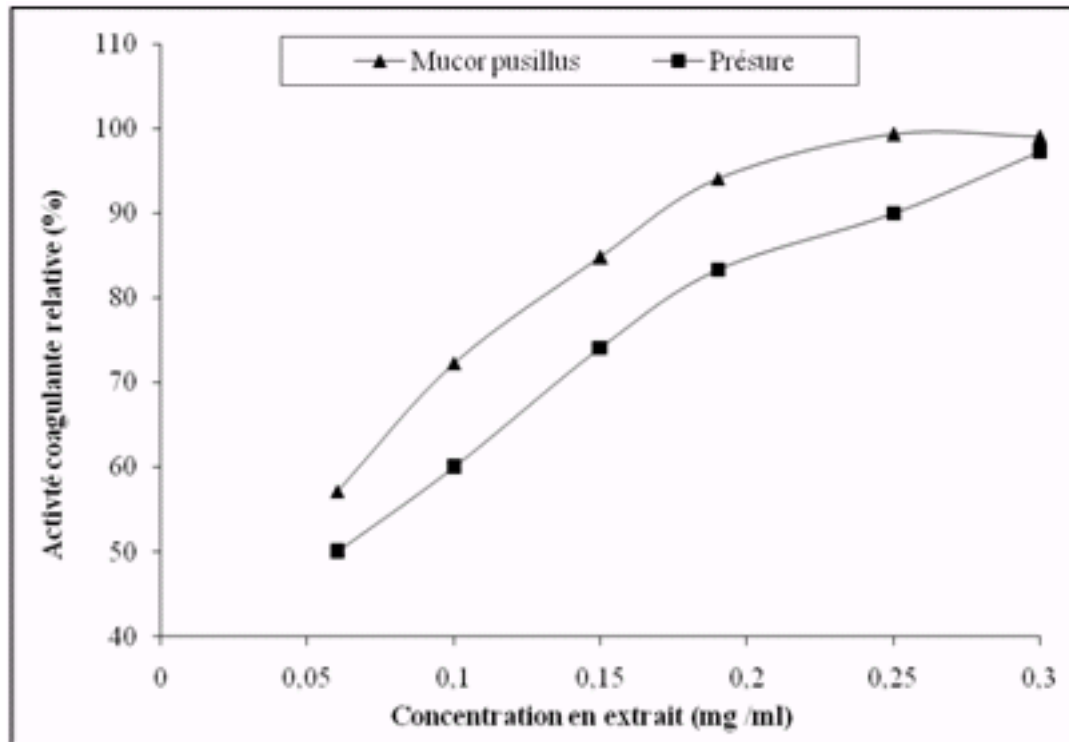


Figure II.20 : Influence de la concentration en extrait coagulant sur l'activité coagulante de l'extrait purifié de *Mucorpusillus*.

Etude de la stabilité de l'extrait

Stabilité thermique

La stabilité thermique de l'extrait fongique purifié, comparé à la présure, a été étudiée en le maintenant pendant 30 mn à des températures allant de 30°C à 65°C.

Les résultats illustrés par la **figure II.21** indiquent que l'activité de la coagulase de *Mucorpusillus* est relativement stable dans l'intervalle de température compris entre 30°C et 50°C. Par contre, la présure animale exprime déjà à 45°C une baisse d'activité.

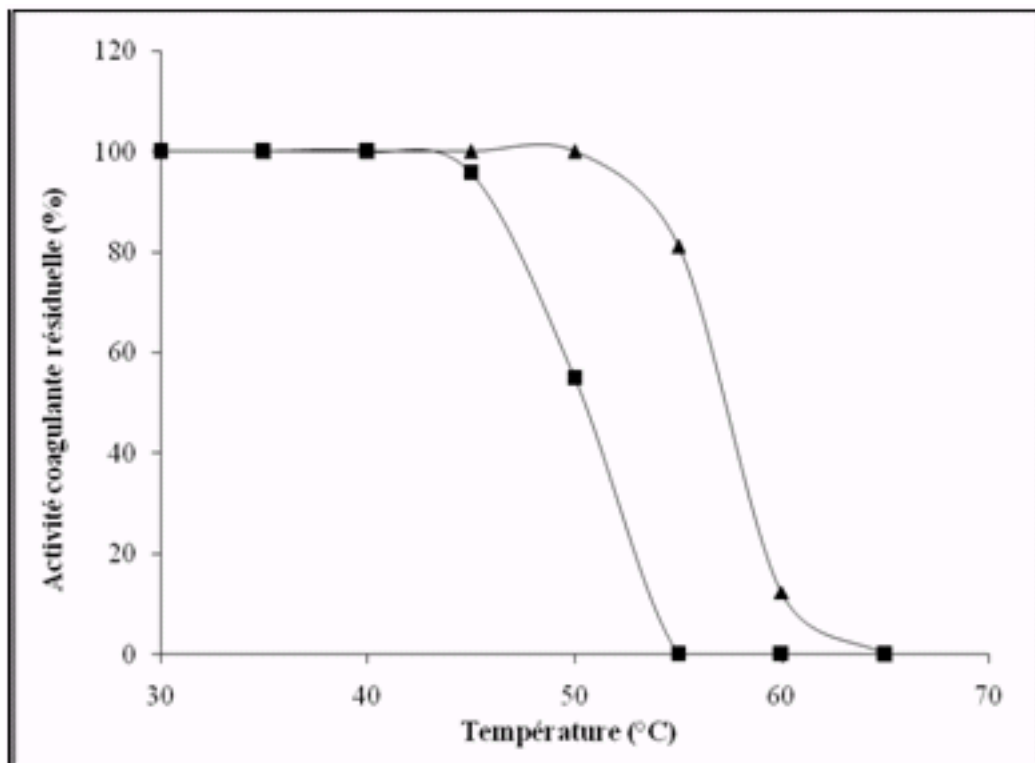
Pour des températures supérieures à 50°C, la protéase fongique présente une baisse d'abord progressive de son activité coagulante (à 55°C) puis rapide (à 60°C) ; températures pour lesquelles la présure animale est complètement détruite pour effet de dénaturation de la structure de l'enzyme.

Selon ALAIS (1984), quand la température s'élève au dessus de 50°C, la dénaturation de la présure devient sensible ; les enzymes fongiques sont plus résistantes au chauffage ce qui explique que la température optimale de la coagulation soit plus élevée. Effectivement, les travaux de **SOMKUTI et BABEL (1968)** et ceux de **PREETHA et BOOPATHY (1997)**

ont indiqué une température d'inactivation de 65°C pour la coagulase du genre *Mucor*. En revanche, l'inactivation thermique de la protéase de *Rhizopus oryzae*, rapportée par **KUMAR et al. (2004)**, a lieu à 72°C.

MATOUB (2000), a indiquée une stabilité thermique d'une coagulase produite par une souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée LC₃₃ comprise entre 30°C et 50°C pour une durée d'exposition de 30 mn.

En général, les coagulases microbiennes et végétales se montrent plus stables aux températures plus élevées que la présure animale.



Présure ■, *Mucor Pusillus* ▲.

Figure II.21 : Stabilité thermique de l'extrait purifié de *Mucor pusillus* et de la présure.

Stabilité à la conservation à + 4° C et à – 18° C

L'étude de la stabilité au cours de la conservation a été réalisée par l'entreposage de l'extrait purifié de *Mucor pusillus* à + 4°C et à –18°C. L'activité coagulante résiduelle, exprimée en pourcentage par rapport à l'activité coagulante initiale, a été évaluée périodiquement.

Les résultats, illustrés par la **figure II.22**, indiquent une baisse d'activité à partir de 21 jours de conservation à + 4° C. Au bout de 28 jours, l'activité résiduelle de l'extrait coagulant purifié est de 82,1 %. Au-delà, l'activité coagulante continue à baisser progressivement. Cependant, l'extrait purifié de *Mucor pusillus* ne montre aucune baisse d'activité, à –18°C, au bout de 56 jours ; à 70 jours, l'enzyme perd 23,38 % de son activité initiale.

En général, les enzymes conservées à + 4°C gardent une activité résiduelle qui dépend de l'origine et de la pureté des extraits. De plus, elles se conservent mieux aux basses températures (congélation). Néanmoins, ce procédé est plus coûteux pour une enzyme industrielle, bien que la lyophilisation demeure la méthode la plus sûre dans la conservation des souches microbiennes à forte valeur ajoutée.

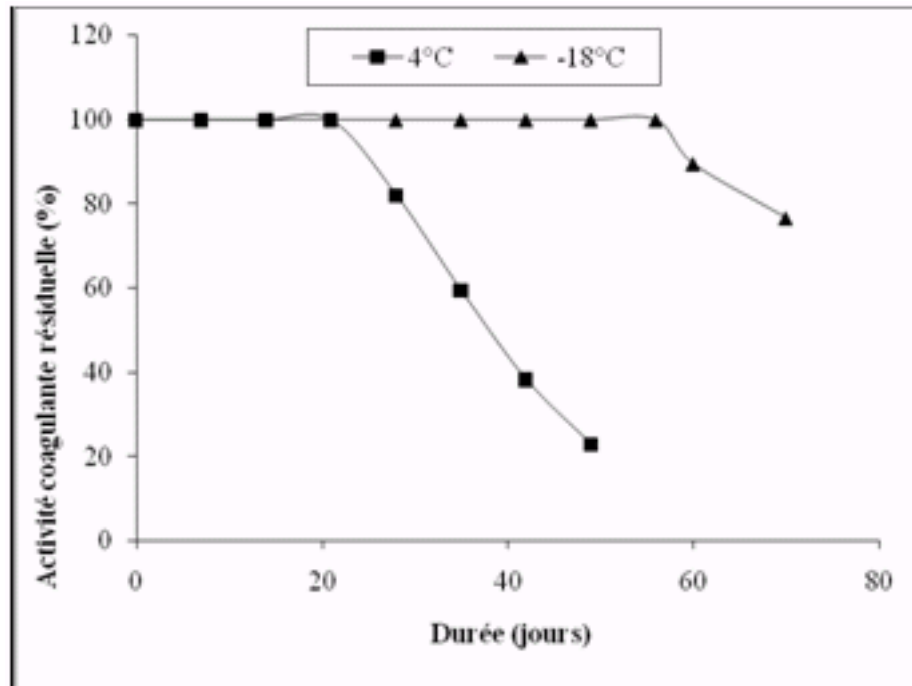


Figure II.22 : Stabilité de l'extrait purifié de *Mucor pusillus* au cours de la conservation.

3 – Activité protéolytique

L'évolution de l'azote non protéique au cours de l'hydrolyse enzymatique a été rapportée par la **figure II.23**

Les résultats obtenus montrent que l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut évolue fortement avec la durée de contact enzyme-substrat par rapport à l'extrait purifié et à la présure animale. On distingue deux phases pour l'extrait brut : la première durant laquelle une forte augmentation du taux de l'azote non protéique (entre 10 à 90 mn de contact).

Ce résultat laisse supposer qu'il y a eu hydrolyse des protéines et libération des acides aminés libres et des peptides de faible poids moléculaire. La seconde phase correspond à un pallier durant laquelle la protéolyse générale est relativement stable (90 – 180 mn d'incubation).

Par ailleurs, le taux de dégradation de la caséine évolue faiblement avec la durée d'incubation pour la présure. Par contre, la protéolyse de l'extrait enzymatique purifié évolue rapidement pour atteindre un maximum au bout d'une heure d'incubation, au delà, elle diminue.

L'activité excessive de l'extrait coagulant brut du *Mucor pusillus*, par comparaison à la présure et à l'extrait purifié, est probablement due à l'action non spécifique de la protéase fongique envers les autres fractions de caséines du lait particulièrement α_S , et β caséine).

Les enzymes microbiennes et végétales manifestent une forte activité protéolytique par comparaison aux protéases d'origine animale. En effet, selon certains auteurs (**ALAIS, 1984** ; **PREETHA et BOOPATHY, 1997** ; **KRAUSE et al. 1998**), les enzymes fongiques manifestent une activité plus grande que celle de la présure et de la pepsine. En général, les coagulases doivent développer une activité faible de protéolyse générale

capable de se manifester sur toutes les protéines du lait pendant l'affinage afin de préserver les caractères organoleptiques des fromages.

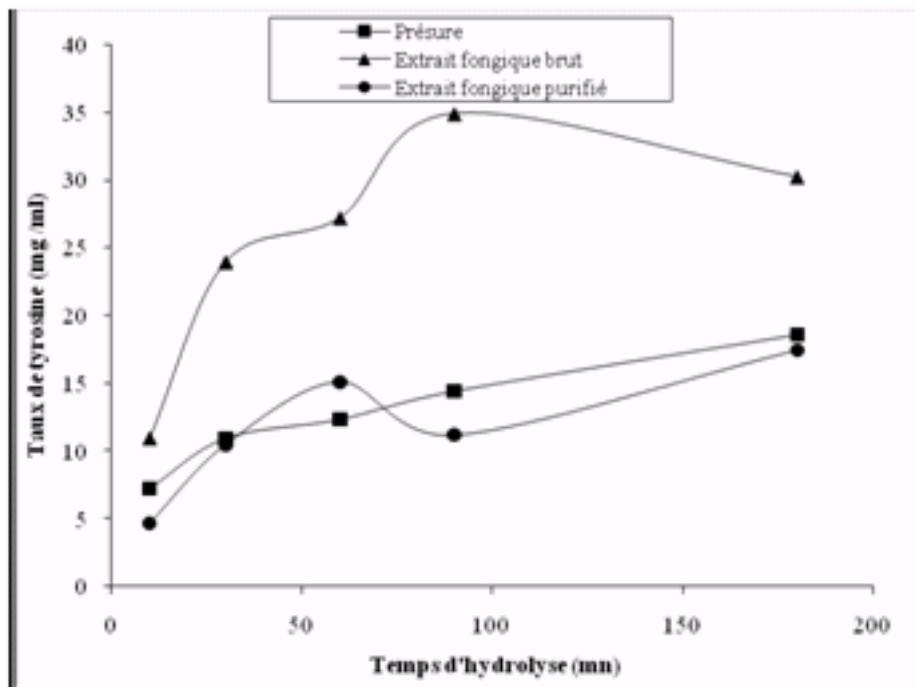


Figure II.23 : Activité protéolytique des extraits bruts et purifiés de *Mucor pusillus* et de la présure

4- Estimation du poids moléculaire

La détermination du poids moléculaire a été réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, en présence de sodium dodecyl sulfate (S.D.S.) (**Figure II. 24**) et par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100 (**Figure II.25**).

L'évaluation approximative de la masse moléculaire a été réalisée par l'élution des protéines à poids moléculaire connu (BSA : 67 000 Da, pepsine : 35 000 Da et trypsine : 23 800 Da), sur Sephadex G-100 dans les mêmes conditions que l'échantillon expérimental. Le profil électrophoretique montre que la fraction active étudiée fait apparaître une seule bande homogène.

D'après le courbe étalonnage obtenu avec les marqueurs à poids connu et séparés dans les mêmes conditions, la masse moléculaire de la fraction coagulante est de l'ordre 49 000 Da, PM qui demeure à notre avis énigmatique pour le genre *Mucor* et confirme par une analyse protéomique avec un PM proche des valeurs obtenues avec les techniques classiques.

En effet, l'étude de la protéase par le logiciel Scaffold et l'analyse des similitudes des protéines avec une probabilité d'identification supérieure à 95%, fait apparaître un poids moléculaire de 46 kDa pour une séquence de la protéase de 427 acides aminés

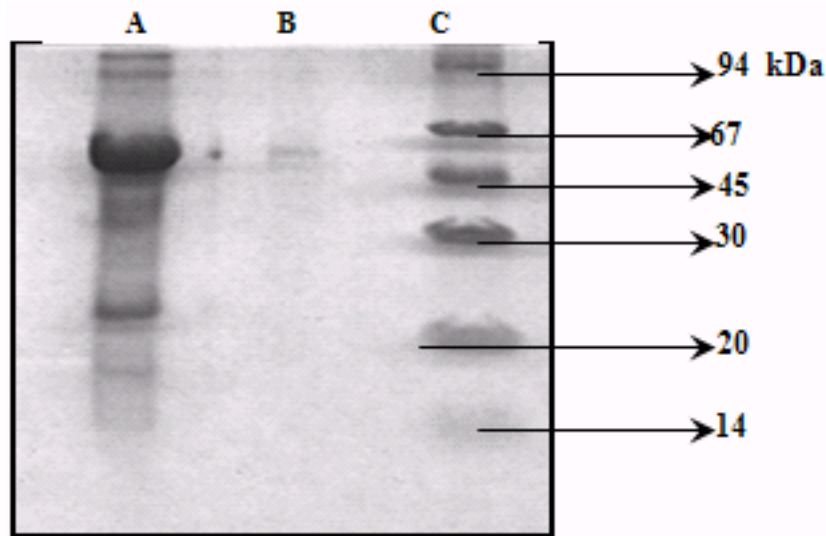


Figure II.24 : Electrophorèse SDS-PAGE des extraits de *Mucor pusillus*.

A – Extrait enzymatique lyophilisé, B – Fraction issue de la filtration sur gel
C – Kit standard protéiques

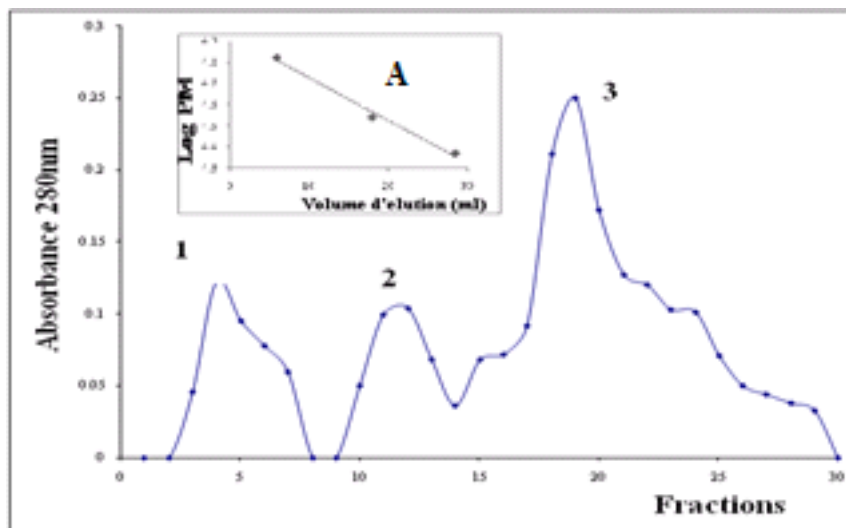


Figure II.25 : Profil d'élution sur Sephadex G-100 de marqueurs protéiques B.S.A.

67 000 Da, (2) pepsine : 35 000 Da, (3) trypsine : 23 800 Da. Colonne Pharmacia (1 x 60 cm), tampon d'élution : phosphate (0,02 M ; pH 6), débit : 2 ml / h, fraction : 1,5 ml. – **A :** Courbe étalon de protéines standards $\text{Log PM} = f(\text{Ve})$

(**Figure II. 26a,b,c et Tableau II. 6**)). Nos résultats ne concordent pas avec ceux rapportés par la littérature. Selon **ARECES et al. (1992)** cité par Fernandez-Lahore et al. (1999), les protéases fongiques sont caractérisées par un poids moléculaire variant de 32 000 à 34 000 Da. Ce résultat est confirmé par certains auteurs (**BELYAUSKAITE et al. 1979 ; LENOIR et al. 1979 ; FERNANDEZ-LAHOIRE et al. , 1999 et KUMAR et al. , 2005**), en étudiant respectivement les coagulases purifiées de *Mucor rennisus*, *Penicillium caseicolum*, *Mucor sp.* et *Rhizopus oryzae*.

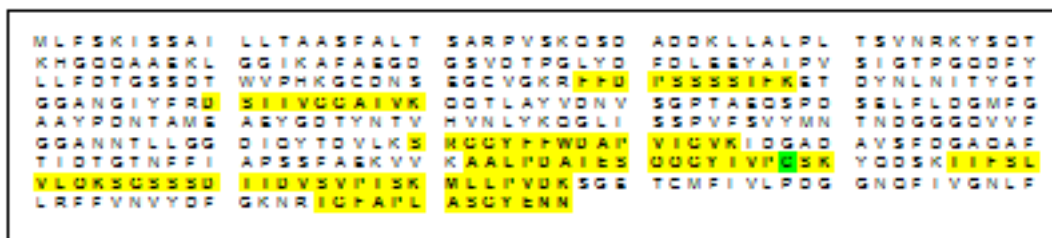


Figure II.26a : Séquence des acides aminés dans la protéase coagulante purifiée de *Mucor pusillus* (traitement d'identification des protéines par Scaffold Software 2.0)

Sequence Coverage	Protein	Accession	Prob.	%Spec	#Pept	#Frag	#Spec	%Cov	Weight
	CARP_RHIP1 Mucorpepsin [Mucorpusillus]	P09177	100%	25%	9	9	100	24%	45621
	Q9UQZ5_RHIP1 Milk-clotting aspartic protease ...	Q9UQZ5	100%	25%	9	9	100	24%	45605

Figure II.26b : Identification des protéines similaires

Index	Peptide	Exclusive To	Valid	CARP_RHIP...	
				P09177	Q9UQZ5
1	AALPDATESQQGYTVPCK	CARP_RHIP...	<input checked="" type="checkbox"/>	95%	95%
2	DSITVGGATYK	CARP_RHIP...	<input checked="" type="checkbox"/>	95%	95%
3	FFDPSSSSTFK	CARP_RHIP...	<input checked="" type="checkbox"/>	95%	95%
4	GGYFFWDAPVTGVK	CARP_RHIP...	<input checked="" type="checkbox"/>	95%	95%
5	IGFAPLASGYENN	CARP_RHIP...	<input checked="" type="checkbox"/>	95%	95%
6	MLLPVDK	CARP_RHIP...	<input checked="" type="checkbox"/>	90%	90%
7	SGSSSDITDVSVPISK	CARP_RHIP...	<input checked="" type="checkbox"/>	95%	95%
8	SRGGYFFWDAPVTGVK	CARP_RHIP...	<input checked="" type="checkbox"/>	87%	87%
9	TTFSLVLQK	CARP_RHIP...	<input checked="" type="checkbox"/>	95%	95%

Figures II.26c : Identification des peptides similaires (7 peptides) avec une probabilité d'au moins 95% (en jaune, peptides non similaires donnees a titre indicatif)

La différence de poids moléculaire indique que cette caractéristique dépend de l'origine de la coagulase. Ainsi, les travaux portés sur les coagulases animales ont indiqué des poids moléculaires compris entre 31 000 et 37 000 Da (**FOX et WHITAKER, 1977**). Selon **GARNOT et MARTIN (1980)**, la chymosine et la pepsine sont caractérisées par une masse de 30 000 Da et de 35 000 Da respectivement. Par ailleurs, des poids moléculaires de l'ordre de 67 000 Da et de 62 000 Da ont été rapportés pour les coagulases d'origine végétale (**LLORENTE et al., 2004 ; SIDRACH et al., 2005**). Dans notre cas, seule l'hypothèse d'une mutation de la souche au cours des diverses expérimentations semble être envisageable pour expliquer l'augmentation de la masse moléculaire de l'enzyme.

Tableau II. 6 : Séquence des acides aminés dans la protéase coagulante purifiée de *Mucor pusillus* et pourcentage de résidus d'Acides Aminés (%) (PM=45.646,8 Da)

Acides amines	Nombre de résidus	Résidus A.A (%)	Acides amines	Nombre de résidus	Résidus A.A %
Alanine	33	7,72	Thréonine	32	7,49
Valine	31	7,25	Cystéine	04	0,93
Leucine	31	7,25	Tyrosine	19	4,44
Isoleucine	18	4,21	Asparagine	20	4,68
Proline	19	4,44	Glutamine	17	3,98
Méthionine	06	1,40	Ac. aspartique	34	7,96
Phénylalanine	29	6,79	Ac. glutamique	14	3,27
Tryptophane	02	0,46	Lysine	22	5,15
Glycine	45	10,53	Arginine	07	1,63
Serine	41	9,60	Histidine	03	0,70
Total				427	100

CONCLUSION

L'objectif de cette étude est de contribuer à une meilleure connaissance d'une protéase coagulant le lait, issue de la culture de la souche de *Mucor pusillus* à travers l'optimisation des conditions de purification et la nécessité de réduire les pertes d'activité de l'enzyme et des rendements protéiques. Les résultats montrent que l'extrait enzymatique brut, obtenu à partir de la culture en surface de *Mucor pusillus*, est caractérisé par une force coagulante brute de 1 /1200, une activité jugée acceptable pour un emploi en technologie fromagère. Par ailleurs et à travers les différents protocoles de purification appliqués, il a été conclu que l'étape du fractionnement au sulfate d'ammonium (40- 80 % de saturation) de l'extrait enzymatique brut de la souche fongique étudiée n'est pas préconisée. En effet, une chute importante de l'activité coagulante a été constatée (28,53 %) avec un facteur de purification voisin de 3. De plus, l'étude électrophorétique sur SDS- PAGE ne montre aucune différence entre l'extrait précipité par fractionnement et celui précipité directement à 80 % de saturation. Par ailleurs, des bilans de purification il s'avère qu'il est plus intéressant de récupérer une quantité de 6 % des protéines du départ avec une activité de 44,54 % après gel filtration (protocole I) qui semble techniquement plus rationnelle par rapport au protocole II. L'emploi de la technique de chromatographie d'exclusion dans le processus de purification semble plus intéressant. En effet, sur des extraits bruts lyophilisés, elle a permis d'obtenir un meilleur rendement de l'ordre de 55,13 tout en multipliant par un facteur de 20,88 l'activité spécifique de la coagulase comparée à l'échangeuse d'ions, qui pour un rendement en activité sensiblement équivalent a donné un facteur de purification de 6,75. Dans une autre approche de l'étude, l'activité protéolytique manifestée par les protéases lors du processus de coagulation du lait et au cours de l'affinage des fromages est déterminant en fromagerie et une cinétique très ralentie est recherchée. Les protocoles de purifications ne semblent avoir aucun impact sur l'activité des protéases purifiées. Les résultats enregistrés pour une protéase issue d'une espèce microbienne approuvée par le Codex et la FDA, confirment la possibilité de son emploi comme une enzyme de remplacement de la présure traditionnelle en fromagerie.

Actuellement les substituts d'origine fongique dominent le marché mondial des agents coagulant le lait comparés aux présures de remplacement d'origine animale. Certes, le génie génétique a développé le clonage de la Chymosine de veau et constitue aujourd'hui, avec quelques rares restrictions réglementaires une autre voie d'application dont l'emploi

en fromagerie est en pleine croissance. Qu'en est-il de l'intérêt d'explorer la biodiversité végétale, source bon marché de beaucoup de métabolites naturels que les scientifiques aujourd'hui en font l'éloge. A travers le Chapitre II, on s'efforce d'explorer le mécanisme de production et de caractérisation des enzymes d'intérêt fromager à partir de déchets de produits comestibles, l'artichaut et le figuier et dont les caractères intrinsèques seront confrontés à ceux d'une présure industrielle.

CHAPITRE III CARACTERISATION DES EXTRAITS COAGULANTS PURIFIES OBTENUS A PARTIR DES FLEURS D'ARTICHAUT (CYNARA SCOLYMUS) ET DU LATEX DE FIGUIER (FICUS CARICA) EN VUE DE LEUR UTILISATION DANS LA FABRICATION DES FROMAGES TRADITIONNELS EN ALGERIE

INTRODUCTION :

Les succédanés de la présure traditionnelle constituent aujourd'hui d'excellents substrats de substitution dans l'industrie fromagère. Cependant, l'exclusivité de remplacement est détenue par les enzymes d'origine fongique (*Mucor* et *Aspergillus*), la pepsine bovine et la pepsine porcine. La recherche d'autres enzymes coagulantes , notamment végétales et animales est restée toujours au stade expérimental et n'a pu aboutir à une application industrielle, bien que des études ont montre un regain intérêt de ces enzymes sur le plan stabilité et propriétés technologiques.

Il est bien connu que les coagulants de plantes, en général, ne sont pas considérés comme étant très adéquats pour la production fromagère en raison du faible rendement et de la qualité inférieure du produit obtenu. Cependant, le succès des coagulants de *Cynara* sp. est probablement dû aux caractéristiques uniques et spécifiques de ces enzymes et ressemblent à la Chymosine par plusieurs aspects (**MACEDO et al ., 1993**) et dont l'exclusivité est détenue par l'espèce de *Cynara cardunculus*, contrairement a la ficine , une protéase a serine dont l'emploi a l'état brut en fromagerie traditionnelle demeure toujours limitée. Dans un autre volet de la recherche, la cynarase, protéase extraite de l'artichaut (*Cynara scolymus*) dont les propriétés et les applications sont moins connues (**VERISSIMO et al. 1998**), est peu utilisée en technologie fromagere en raison de son caractère de plante comestible

En raison de nouvelles habitudes alimentaires, des travaux très récents menés sur des substrats de plantes ont été publiés montrant le nouvel intérêt que suscite les protéases d'origine végétale (**KASUNARI et al., 2000 ; UCHIKOBA et al., 2000 ; SOUSA et MALCATA, 2002 ; PARDO et al., 2001 ; EGITO ET AL., 2007; TEJADA et al., 2008; CHAZARRA et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2008; LOW et al., 2006**). Des essais de purification plus poussée et une connaissance plus

approfondie des mécanismes biochimiques de ces enzymes sont devenus le centre d'intérêt des chercheurs.

En Algérie, la fromagerie traditionnelle a toujours utilisé des extraits coagulants végétaux à l'état brut obtenus à partir de la sève de figuier, des fleurs de cardon ou des graines de citrouille pour la préparation des fromages frais. Ce sont le *Djeben* à base de lait de chèvre et de brebis dans le nord algérien, le *Kemaria* à base de lait de vache, de chèvre et parfois de la chamelle au sud dont **QUEZEL ET SANTA (1962)** ont établi la liste de la flore à pouvoir coagulant des régions du nord et désertiques. Les produits sont destinés au marché et à la consommation locale et demeurent une forme de valorisation des laits issus des différents cheptels. Cependant, les produits sont caractérisés par une qualité microbiologique et sensorielle médiocre qui demeure tributaire d'une meilleure connaissance des caractéristiques de la protéase car plusieurs facteurs comme la température, le pH, la concentration en enzyme et la concentration en ions Ca^{++} contrôlent le mécanisme de la coagulation du lait (**BRINGE ET KINSELLA, 1986; OKIBGO et al., 1985; DAVIAU et al., 2000; GUNASEKARAN ET AY, 1996; PAYNE et al., 1993; PICON et al., 1995**). Si l'emploi de la ficine en fromagerie traditionnelle présente une certaine réticence au vu des rares travaux réalisés, l'utilisation de la cynarase de l'artichaut est actuellement recommandée (**CHAZARRA et al., 2007; SIDRACH et al., 2005; SILVA et MALCATA, 2000; VERISSIMO et al., 1998**). Notre présent travail s'inscrit dans une optique de recherche qui vise à une meilleure connaissance des protéases végétales en étudiant les aptitudes à la coagulation du lait, la stabilité durant la conservation et les propriétés physico-chimiques des coagulases purifiées extraites des fleurs d'artichaut (*Cynara scolymus*) et du latex de figuier (*Ficus carica L*) comparativement à la présure de référence. Cet aspect pourrait contribuer à promouvoir la fromagerie traditionnelle par l'amélioration de la qualité des fromages artisanaux pour une fabrication future.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique et extraction des enzymes coagulantes

Les fleurs d'artichaut des capitules frais et bien développés sont issues de la production de la saison hivernale (février) et proviennent du marché. La variété employée dans notre étude est le cultivar dénommé « violet », c'est une variété très exploitée en Algérie entre les mois de janvier et juin et génère beaucoup de déchets à la consommation. Les fleurs sont mises à sécher durant environ trois semaines à température ambiante ne dépassant pas 25°C et à l'abri de la lumière, en les éparpillant sur papier filtre selon le procédé employé par **TSOULI (1974)**. L'extraction est réalisée sur 10 g de fleurs sèches à l'aide d'une solution tampon d'acétate de sodium à 0,1M, pH 5 additionnée d'acide borique à 0,2% selon le procédé optimisé au laboratoire. Après macération pendant 24 heures sous agitation douce puis congélation et décongélation, la solution obtenue est centrifugée à 1000 tr/mn pendant 45 mn à 4°C. Le surnageant récupéré subit deux filtrations successives, sur papier filtre, puis une filtration sous vide sur membrane de 0,4 microns. L'extrait enzymatique brut est ajusté au pH 5, pH de stabilité enzymatique (**LAURENT, 1974; TSOULI, 1974**). Afin d'éliminer le brunissement excessif des extraits, la décoloration a été réalisée par passage de la solution enzymatique à travers une colonne semi préparative (pharmacia, 40 x 2,5 cm) de gel *Sephadex G-50*.

La sève brute de *Ficus carica* provient de la variété « Onk l'hmam » très répandue dans le nord de l'Algérie et les régions du littoral, elle est récupérée sur toutes les parties de la plante. 10 ml de latex sont centrifugés à 3200g pendant 15 min. pour l'élimination de la gomme (RIFAAT et al., 1970; LOW et al., 2005). Le surnageant qui constitue l'extrait enzymatique brut est ajusté au pH 5 à l'aide d'une solution concentrée d'acide chlorhydrique et conservé à -18°C jusqu'à utilisation. La dépigmentation des extraits a été réalisée comme décrit précédemment.

La présure de référence est une enzyme standard sous forme liquide d'origine bovine (80% chymosine et 20% pepsine, BELL France) de force 1/10.000, utilisée par la laiterie fromagerie de Boudouaou (Algérie) pour la fabrication de l'Edam. La concentration en protéine est ajustée à 1,23mg/ml selon **DEHOVE (1990)**.

2. Méthodes

2.1 Purification des extraits coagulants

Les extraits enzymatiques bruts ont été purifiés à travers un gel haute résolution *Sephacryl S-200* sur une colonne type *Spectra/chromTM LC, 80cm x 1,5cm* préalablement équilibré à l'aide d'une solution tampon acétate 0,01M, pH 5 avec un débit d'élution de 0,2 ml/min. Les fractions actives sont rassemblées et conservées à -18°C. Les fractions actives récupérées constituant l'enzyme purifiée, sont destinées à l'étude de la caractérisation sans pour autant analyser les profils chromatographiques.

2.2 Mesure de l'activité coagulante

L'activité coagulante est déterminée selon la méthode de **BERRIDGE (1952)** modifiée par **COLLIN et al. (1977)**. Cette méthode permet d'exprimer l'activité de l'extrait enzymatique en Force coagulante. Elle représente le volume de lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique en 40 min., à 35°C et à pH 6,4 selon la formule $2400V/tv$ ou v (volume d'extrait enzymatique, ml), V (volume de lait, ml) et t (temps de prise, secondes). Le substrat de Berridge est composé de poudre de lait à 120 g/l (poudre *low heat*) à 0% de matière grasse) additionnée de 0.01Mole de $CaCl_2$

2.3 Mesure de l'activité spécifique

L'activité spécifique est calculée à partir de la formule : Activité coagulante/mg de protéine.

2.4 Détermination des protéines

Le dosage des protéines des extraits coagulants est effectué selon la méthode de **BRADFORD (1976)** dans une gamme de sensibilité de 0-10µg. La concentration est déterminée à partir d'une courbe standard le sérum d'albumine bovin (*SAB, Sigma chemical*).

2.5 Caractérisation des extraits coagulants purifiés et de la présure

L'activité coagulante optimum sur le lait des extraits enzymatiques purifiés et de la présure est déterminée selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante (35°C, pH

6,4) en observant le temps de coagulation du lait en faisant varier les valeurs du paramètre étudié. Elle est exprimée en activité relative (%).

2.4.1 pH optimum

Le pH optimum de coagulation du lait est déterminé en observant le temps le plus court de coagulation dans un intervalle de pH compris entre 5 et 8.

2.4.2 Température optimum

L'activité enzymatique des extraits est déterminée dans un intervalle de température de coagulation du lait comprise entre 25 et 90°C.

2.4.3 Concentration optimum en CaCl₂

La Concentration optimum en CaCl₂ est déterminée en observant le temps de coagulation du lait additionné de CaCl₂ à des concentrations comprises entre 0,001 et 0,5 Moles.

2.4.4 Concentration optimum en enzymes

Les volumes des préparations enzymatiques ajoutées au lait varient en fonction du facteur de dilution approprié compris entre 0 et 500 de l'extrait enzymatique initial.

2.4.5 Mesure de l'activité protéolytique

La mesure de l'activité protéolytique des extraits coagulants permet d'évaluer le taux de dégradation de la caséine (*Sigma, biochemicals and reagents*) pendant la réaction primaire. Elle consiste à mesurer l'augmentation de l'azote non protéique (NPN) dans l'acide trichloracétique (TCA) à 12% du mélange final (**HOUINS et al., 1973**).

2.5 Stabilité des enzymes

251. Stabilité thermique et au pH

La stabilité enzymatique a été déterminée par mesure de l'activité résiduelle selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante des extraits purifiés et de la présure après préincubation à des températures comprises entre 25 et 45°C pendant 48 heures. L'effet du pH a été mesuré en ajustant les extraits enzymatiques selon la gamme de pH, citrate (pH 2 et 3), acétate (pH 4 et 5) et phosphate (pH 6 et 7) après 24 heures d'incubation à 4°C.

2.5.2 Conservation des enzymes

Les extraits coagulants sont entreposés à différentes températures, +4°C et à température ambiante (+18/+20°C). L'activité résiduelle est mesurée en fonction du temps de conservation selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1- Résultats des extractions et caractères physicochimiques

La quantité moyenne de fleurs d'artichauts qui peut être récupérée varie selon la dimension des capitules. Elle est d'environ 6 g par kilogramme de capitules, soit 0,6%.

L'avantage que présente l'utilisation de l'artichaut, pour l'obtention d'enzymes coagulantes, est la récupération facile des fleurs à partir des capitules. Son inconvénient majeur réside dans sa faible disponibilité, limitée durant la saison hivernale en Algérie et sa faible activité coagulante. Toutefois, le développement des laitages à base de ce cultivar est tributaire du caractère agricole régional. Pour la sève de figuier, la récupération du système enzymatique est très importante tant à l'état brut qu'à l'état purifié avec un rendement de 80% . En revanche, son obtention demeure délicate en raison de sa texture très visqueuse mais son utilisation passe nécessairement par une purification pour améliorer les propriétés sensorielles du *Djeben*. Les caractéristiques physicochimiques de cette matière première sont représentées dans le **tableau III.1**.

La concentration en protéines totales des préparations enzymatiques coagulantes brutes est relativement faible par rapport à la masse de la matière première employée. Celle du figuier est de 4 fois environ plus élevée que celle de l'artichaut (22 mg/ml contre 5,6 mg/ml) avec un rendement protéique est successivement de 11 et 2,02% (**Figure III.1**). Par ailleurs, l'activité coagulante obtenue est étroitement liée au taux protéique à l'exception de la présure ou l'effet inverse est observé du fait qu'elle est commercialisée sous forme de protéine enzymatique. En effet, à l'état brut, l'extrait de sève de figuier représente la plus forte activité dans un rapport de 1/ 50 par rapport à l'extrait coagulant de l'artichaut (**Figure III.2**). Ce paramètre associé aux caractères apparents de la sève brute affecte les propriétés sensorielles des fromages frais qui manifestent une odeur et une amertume très prononcées, conclusion rapportée par les travaux de **POZNANSKI et al.,(1975)**, **GENIN (1968)**, **SGABIERI et al.,(1964)**, **FAHMI (1973)**, **GARG et al., (1994)** et **WALSTRA et al., (1999)**.

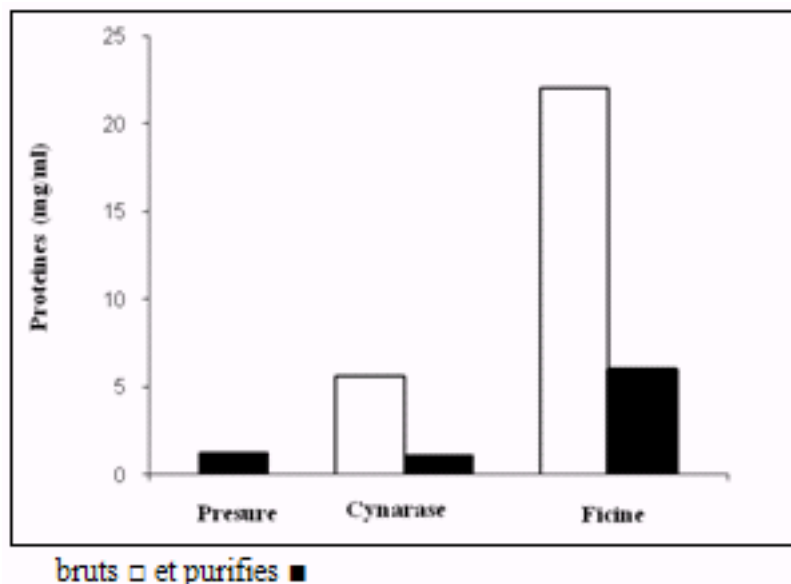


Figure III.1: Concentration en protéines des extraits , de l'artichaut, du figuier et de la présure.

L'excès d'oxydation des extraits bruts conduisant à un brunissement constitue un inconvénient majeur pour l'emploi en technologie fromagère. La clarification par passage sur Sephadex G-50 a permis d'éliminer une part importante des pigments et probablement des peptides de petits poids moléculaires associés à l'enzyme et de récupérer une masse d'enzyme purifiée appréciable pour la suite de l'étude. Les divers adsorbants (bentonites, PVP et échangeur d'ions) et la précipitation au sulfate d'ammonium utilisés par **SIDRACH et al. (2005)** pour clarifier l'extrait brut de l'artichaut cultivé n'ont pas donné de résultats satisfaisants à l'exception d'une décoloration moyenne par ultrafiltration à travers une membrane au seuil de coupure de 10 kDa et une adsorption sur charbon actif (**LLORENTE et al., (2004)**). Cette décoloration permet d'empêcher l'extrait coagulant de communiquer une couleur et une odeur indésirables au lait de fabrication et au fromage.

Matières premières	Période D'obtention	Mode de récupération	Disponibilité	Quantité brute	Quantité nette	viscosité	odeur	couleur	Force	MS %
Artichaut	saisonnière	Facile	importante	6Kg	36g de fleurs	Non visqueux	Végétale	Brun foncé	1/400	3
Figuier	Toute l'année	lente	faible	12 ml de sève	10 ml extrait	visqueux	Prononcée fruitée	Brun clair	1/40.000	10
Présure	Toute l'année	facile	très faible	---	---	Non visqueux	moyenne	Claire à brun	1/10.000 à 100.000	2

Tableau III.1: Caractéristiques physico chimiques des extraits coagulants bruts des fleurs d'artichaut et de la sève de figuier

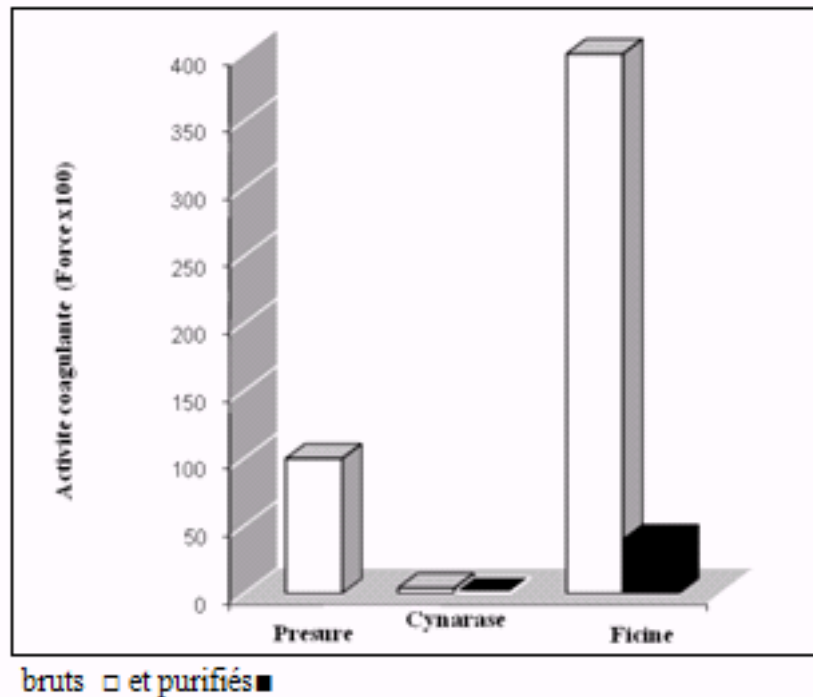


Figure III.2: Activité coagulante (exprime en x 100) des extraits bruts et purifiés

2- Résultats de la purification

La détermination des activités coagulantes des extraits enzymatiques constitue un paramètre important en technologie fromagère. Les fractions purifiées douées d'activité enzymatique présentent des taux protéiques et des forces plus faibles par rapport à l'état brut en raison de la dilution mais débarrassées des protéines inactives.

La chromatographie de gel filtration (profil non étudié) a révélé 1 seule forme de cynarase (*cynara scolymus*) et 2 formes de ficine (*ficus carica*) actives contrairement aux travaux de **VERISSIMO et al.,(1996)** et **SIDRACH et al.,(2005)** qui ont observé 3 formes (cynarase A,B et C), **LLORENTE et al., (2004)** ont isolé 2 formes très actives. Sur la sève de figuier, plusieurs pics doués d'activité coagulante ont été identifiés par ONER et AKAR (1993) par chromatographie échangeuse d'ions. Les concentrations en protéines (**Figure III.1**) sont respectivement de 6 mg/l et 1,05 mg/l pour l'extrait de figuier et de l'artichaut (0,105 et 0,60%) celui de la présure est de 1,23mg/l (0,123%) constituée de 100% de protéines enzymatiques. Ces valeurs sont soit proches soit élevées par rapport à la présure mais ceci ne correspond pas à une activité spécifique élevée. En effet, l'activité spécifique reflète réellement la force de la protéase coagulante et exprime le taux de protéine enzymatique. L'activité spécifique du figuier représente environ 40 fois celle de l'artichaut et seulement 50% de l'activité de la présure commerciale dont la préparation se trouve dans des conditions de stabilité adéquate (**Figure III.2 et III.3**).

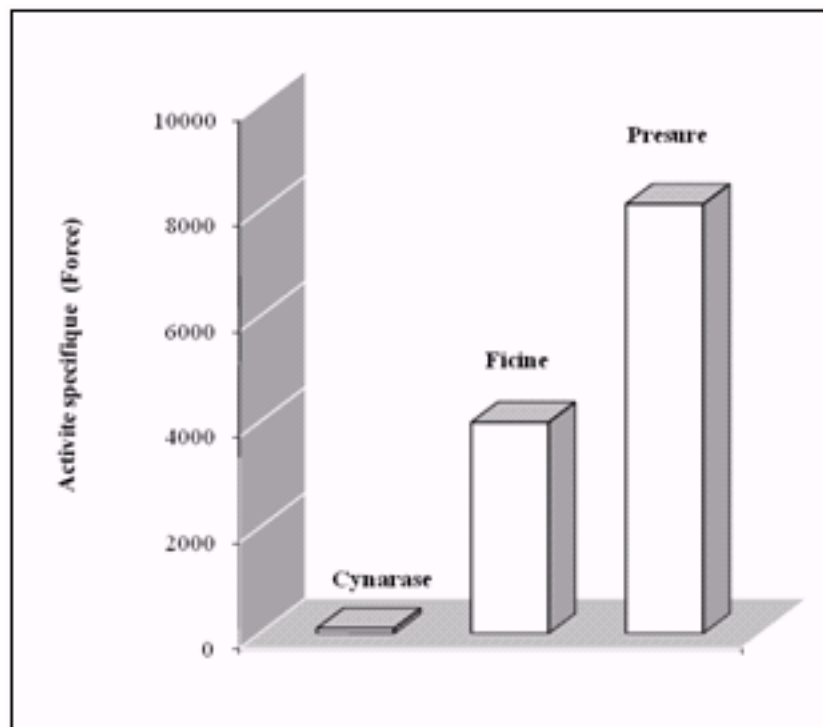


Figure III.3: Activité spécifique des extraits purifiés et de présure

3- Activité protéolytique

Il est certain que les protéases coagulantes présentent une double activité : l'une très spécifique sur la caséine κ , l'autre de protéolyse générale susceptible de se manifester au cours de l'affinage. La protéolyse est l'un des phénomènes les plus importants de l'affinage, car, non seulement elle intervient dans la saveur du fromage, mais également dans son aspect et sa texture. elle se traduit par la libération successive de peptides, puis d'acides aminés. Ces derniers peuvent être dégradés en composés variés, contribuant ainsi à l'apparition de la flaveur.

L'activité protéolytique de la présure est moins importante que celles des enzymes végétales étudiées, alors que celle du figuier a une cinétique plus marquée sur la caséine par rapport à l'artichaut (**Figure III.4**). Selon **PASQUET (1977)**, la pente initiale observée au cours des 20 premières minutes de l'hydrolyse de la caséine correspond à la réaction primaire (clivage *Phe105-Met106*), au delà il n'y a plus libération de l'azote non protéique. Dans notre étude, cette pente initiale n'est pas observée du fait que l'action des enzymes a été mesurée qu'après 1 heure d'hydrolyse mais l'activité protéolytique globale par rapport à la présure a un comportement similaire. L'action de rupture de la liaison *Phe105-Met106* de la caséine κ par les aspartyl protéases comme la cynarase est semblable à celle de la chymosine et les autres

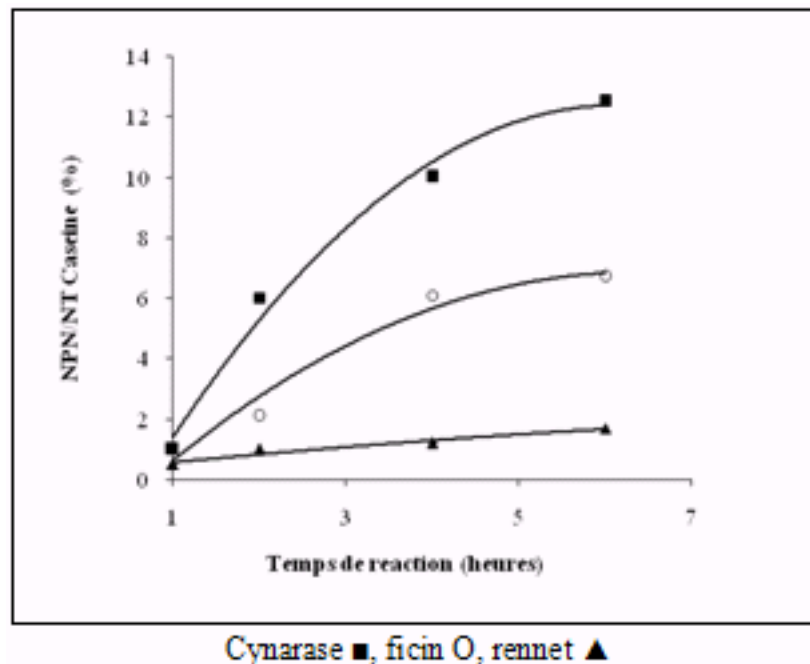


Figure III.4: Activité protéolytique des extraits coagulants

protéases d'origine fongique et bactériennes (**SIDRACH et al., 2005**) et l'effet protéolytique est identique à celui des extraits de *Cynara cardunculus* qui sont largement utilisés dans la fabrication des fromages (**CAMPOS et al., 1990; SILVA ET MALCATA, 1999; SILVA et al., 2002**). Auparavant, **HEIMGARTNER et al., (1990), CORDEIRO et al., (1992)**, ont observé lors d'une étude comparative de l'activité coagulante et protéolytique que les extraits bruts et les formes 1 et 2 de la cynarase manifestent une activité protéolytique excessive comparée à la chymosine due à l'action non spécifique des protéases envers les autres caséines du lait (α_s et β caséines). L'action plus intense observée chez la ficine du figuier induit vraisemblablement les mêmes effets sur les caséines du lait (**FOX et MCSWEENEY, 1998; WALSTRA et al., 1999**). Des observations ont montré que la nature du lait influence l'activité protéolytique des enzymes végétales,

elle est plus importante chez le lait de vache par rapport a celui de la brebis (MARCOS et al.,1980), moins prononcée lorsque l'extrait sec du lait est augmente (RENNER et ABD EL SALAM ,1991; WALSTRA et al. , 1999) et une amertume moins marquée chez les fromages de brebis (BARBOSA et al., 1976; BARBOSA et al., 1981).

4. Propriétés des extraits purifiés

4.1- Température optimale et stabilité thermique des extraits purifiés

Les enzymes d'origine végétale se caractérisent par des températures optimums d'activité bien supérieures à celles observées dans le cas de la présure, elles sont de 80 et 82°C respectivement pour la protéase de l'artichaut et du figuier contre 42°C pour la présure (Figure III.5). Le caractère thermophile de la protéase végétale a été rapportée différemment par CHAZZARA et al., (2007) et SIDRACH et al., (2005) sur la cynarse (70°C), RAPOSO et DOMINGOS (2008) sur la protéase de *Centaurea calcitrapa* (52°C), LO PIERO et al., (2002) sur la lactucine de *lactuca sativa* (50°C). L'étude de la stabilité thermique montre que toutes les enzymes étudiées sont sensibles aux températures élevées, elles perdent leurs activités en fonction du temps d'incubation et de la température du milieu réactionnel (Figure III.6a,III.6b et III.6c). A 45°C , la perte d'activité est très rapide pendant les 8 heures d'incubation, elle est de 80% environ pour la présure et la ficine et de 30 % pour la cynarase et a 55°C, elles sont totalement inactives. La thermostabilité semble exprimer un caractère variétal, des résultats similaires sont rapportés par SIDRACH et al., (2005) , LO PIERO et al., (2002) et LLORENTE et al., (2004) sur des protéases incubées pendant 1 a 4 heures entre 40 et 50°C, par contre la protéase de *centaurea calcitrapa* conserve 100% de son activité initiale a 70°C après 6heures d'incubation (RAPOSO et DOMINGOS ,2008) .

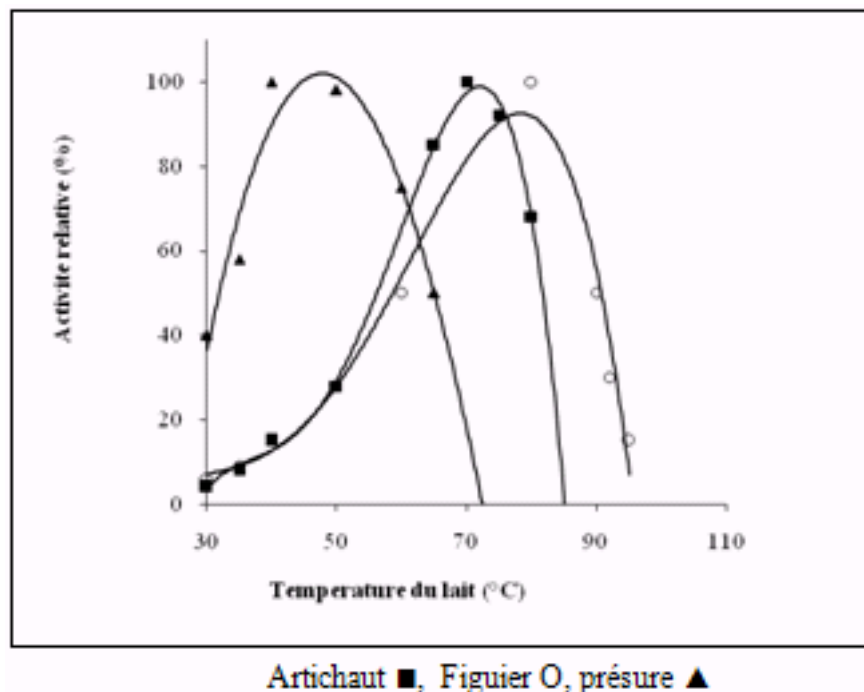


Figure III.5: Activité coagulante relative des extraits coagulants végétaux et de la présure en fonction de la température du lait.

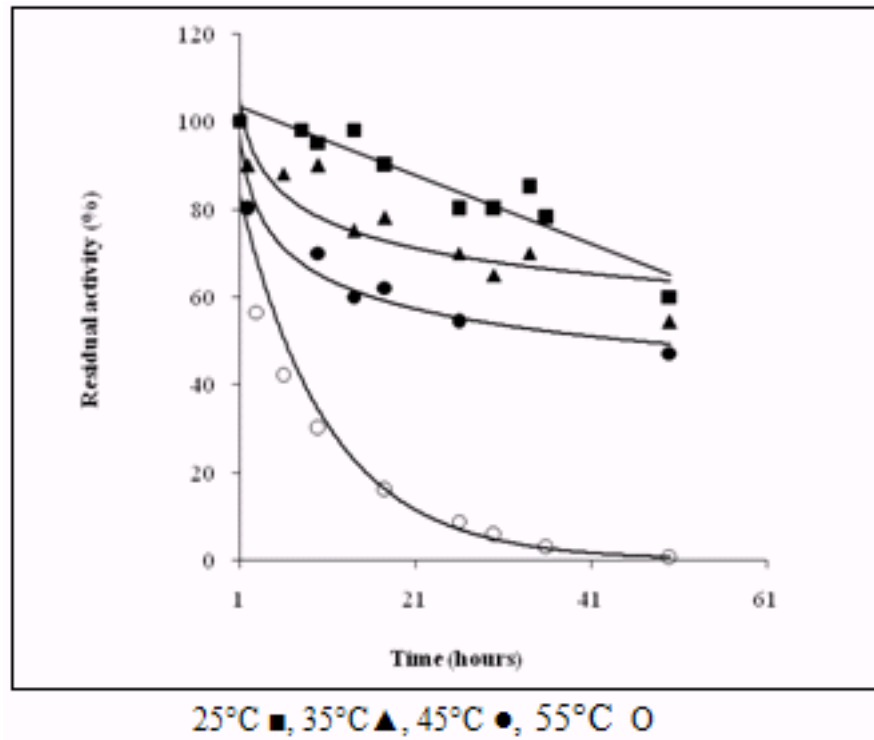


Figure III.6a: Stabilité thermique de l'extrait coagulant d'artichaut en fonction du temps

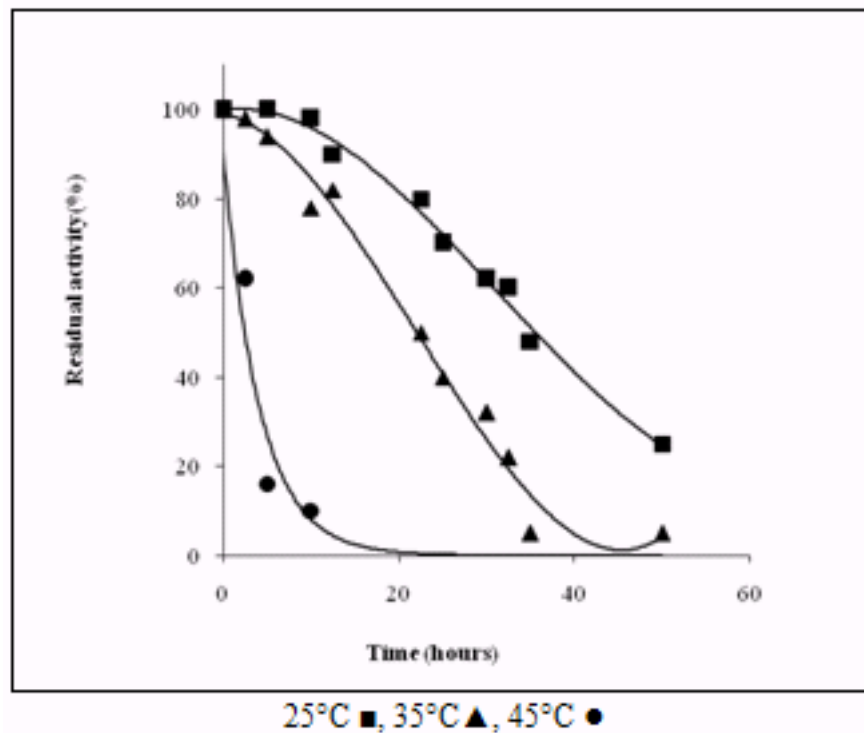


Figure III.6b: Stabilité thermique de l'extrait coagulant du figuier en fonction du temps

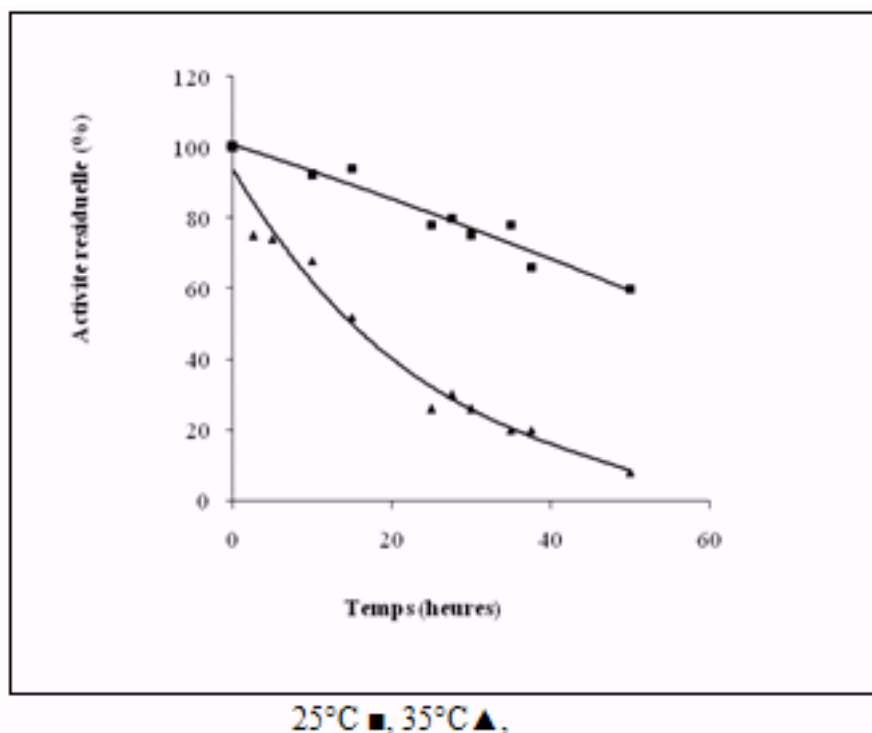
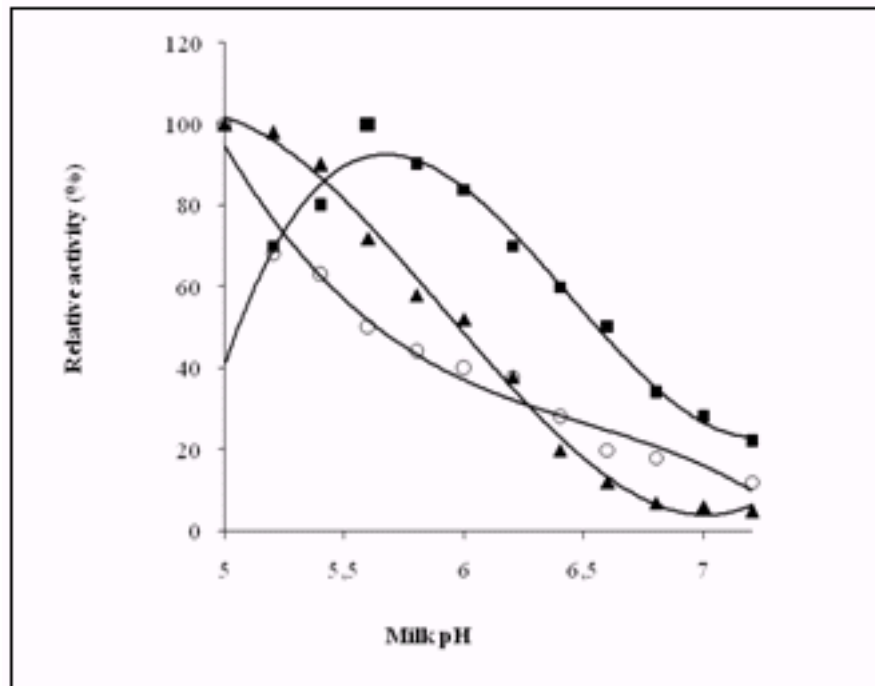


Figure III.6c: Stabilité thermique de la présure en fonction du temps

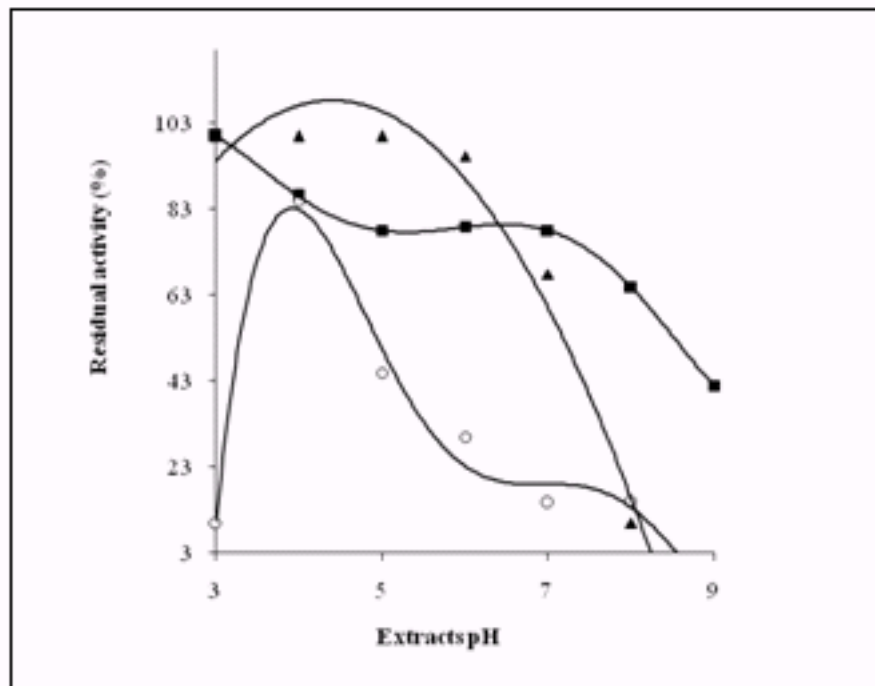
4.2- pH optimum et stabilité des extraits purifiés

La figure III. 7 montre que l'optimum d'activité se situe dans l'intervalle des pH acides, 5 pour l'enzyme du figuier et de la présure et 5,5 pour la protéase de l'artichaut qui semble plus élevé par rapport aux pH rapportés par SIDRACH et al., (2005), LLORENTE et al., (2004) et plus faible comparé au pH 6 de la cardosine (CHEN et al., 2003). A pH proche de la neutralité, la perte d'activité est très importante (80 à 90%), résultat similaire observé par CHAZZARA et al., (2007) et HEIMGARTNER et al., (1990) sur la protéase de *Cynara cardunculus*. Les fromages traditionnels frais et à pâte molle comme les *djeben* à base des laits de petits ruminants supportent mieux la coagulation à ces pH ou la manipulation traditionnelle accélère le processus d'acidification des laits. Par ailleurs, les extraits étudiés sont stables dans le gamme de pH de 3 à 7 et 70 à 100% de l'activité initiale est conservée (Figure III.8) après 24 heures d'incubation à 4°C, au-delà de ce pH la perte d'activité est amorcée, rapide pour l'extrait de figuier et lente pour celui de l'artichaut. Par contre l'activité de la décroît à partir de pH 5. Des résultats similaires sont rapportés par SIDRACH ET AL., (2005) après 60 heures d'incubation à la température de laboratoire.



Artichaut ■, Figuier O, présure ▲

Figure III.7: Activité coagulante relative des extraits coagulants végétaux et de la présure en fonction du pH du lait.

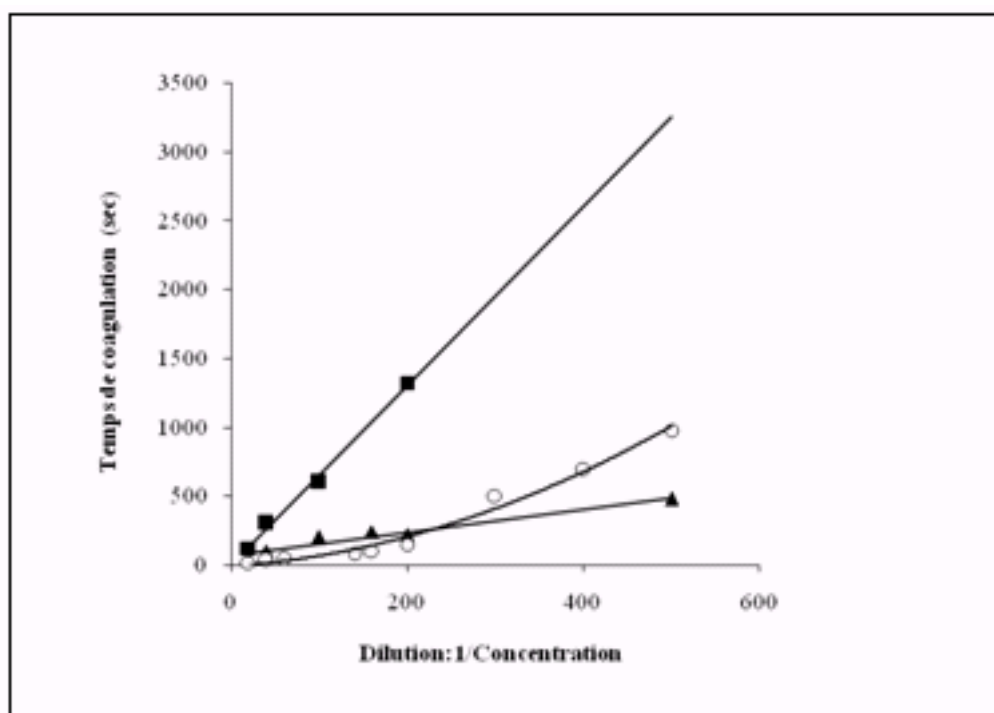


Artichaut ■, Figuier O, présure ▲

Figure III.8: Stabilité au pH des extraits coagulants végétaux et de la présure

4.3- Effet de la concentration en enzyme et en CaCl₂

L'allure des courbes de la **figure III.9** montre que le temps de coagulation croit linéairement avec l'inverse de la concentration en enzymes (exprimes en dilutions enzymatiques), néanmoins ceci est réellement vérifié seulement pour la présure qui manifeste une forte activité aux faibles dose (dilution inférieure a 200) ce qui correspond aux doses utilisées en fromagerie (**GARNOT et MARTIN, 1979**). Ces observations sont confirmées par **CHAZARRA et al., (2007)**, **BENCINI (2002)** et **CHITIPINYTIOL et CRABE (1998)** et **YOUSIF et al.,(1996)** qui expliquent que ce phénomène correspond a l'accroissement de la vitesse de protéolyse de la caséine κ similaire a l'action de la chymosine . Pour ces auteurs , les résultats concordent avec le modèle de cinétique de coagulation du lait proposé par **VANHOODYDONK et WALSTRA (1987)** et repris par **VERISSIMO et al., (1995)** sur la chymosine et par **YOUSIF et al.,(1996)** sur les extraits coagulants végétaux. Dans les conditions standards de la coagulation du lait, les faibles activités spécifiques de l'enzyme nécessite l'emploi de grandes concentrations pour atteindre la formation du gel. Tenant compte de ces observations, Il est clair que l'extrait de *Cynara scolymus* nécessite des doses importantes en fromagerie et à faibles doses le temps de coagulation serait trop lent contrairement a l'extrait de *Ficus carica*.

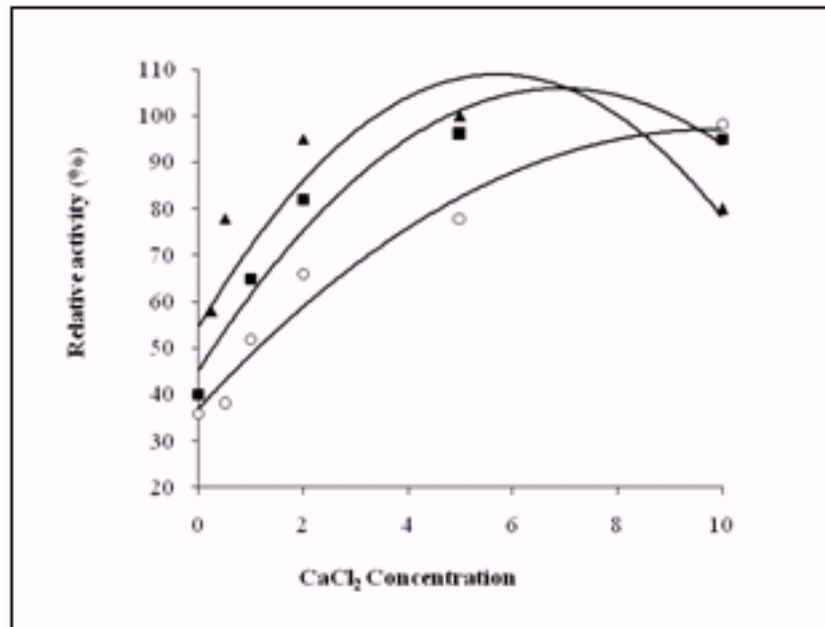


Artichaut ■, Figuier O, présure ▲

Figure III. 9: Relation entre le temps de coagulation et l'inverse de la concentration en extrait coagulant.

Dans l'intervalle de concentration du lait en CaCl_2 utilisé en fromagerie (0 à 20mM), l'activité coagulante augmente progressivement (allure hyperbolique) en fonction de la concentration en CaCl_2 (**Figure III.10**). Elle est rapide pour la présure commerciale (85 à 90%) et lente pour les extraits végétaux (de 50% à 80% pour la coagulase de la sève de figuier et de 12% à 50% pour la coagulase des fleurs d'artichaut). La coagulation du lait par les enzymes étudiées est lente a des concentrations inférieures a 10mM de CaCl_2 , l'enzyme de l'artichaut est la plus sensible. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par plusieurs

auteurs qui ont mis en évidence l'effet des ions Ca^{++} dans le processus de coagulation enzymatique des laits (CHAZARRA et al., 2007; BENCINI, 2002; LAGAUE et al., 2004; NAJERA et al., 2003) contrairement à LO PIERO et al., (2002) qui rapporte que l'addition du CaCl_2 n'affecte pas l'activité catalytique de la lettucine sur la caséine entière.

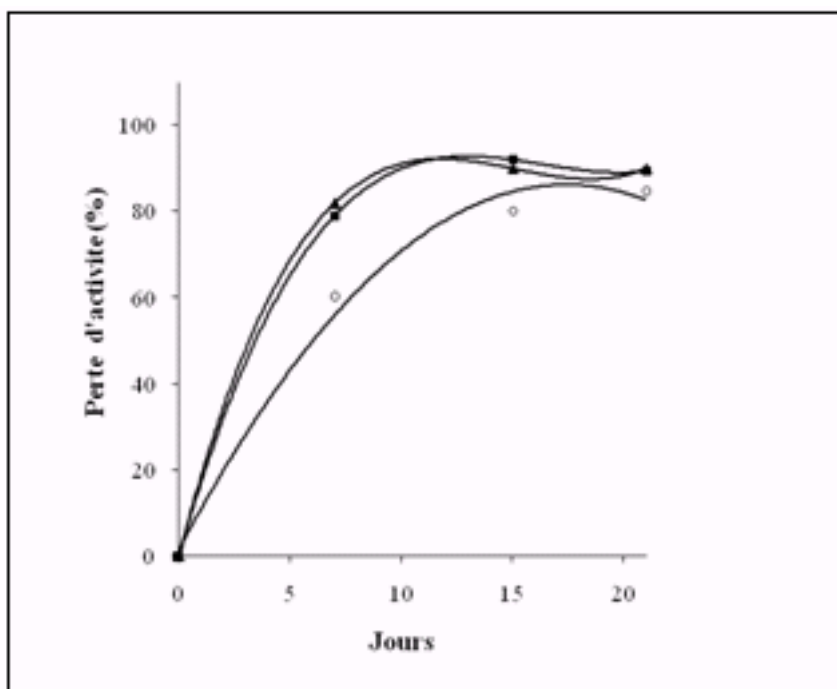


Artichaut ■, Figuier O, présure ▲

Figure III.10: *Activité coagulante relative des extraits coagulants végétaux et de la présure en fonction de la concentration en CaCl_2 du lait.*

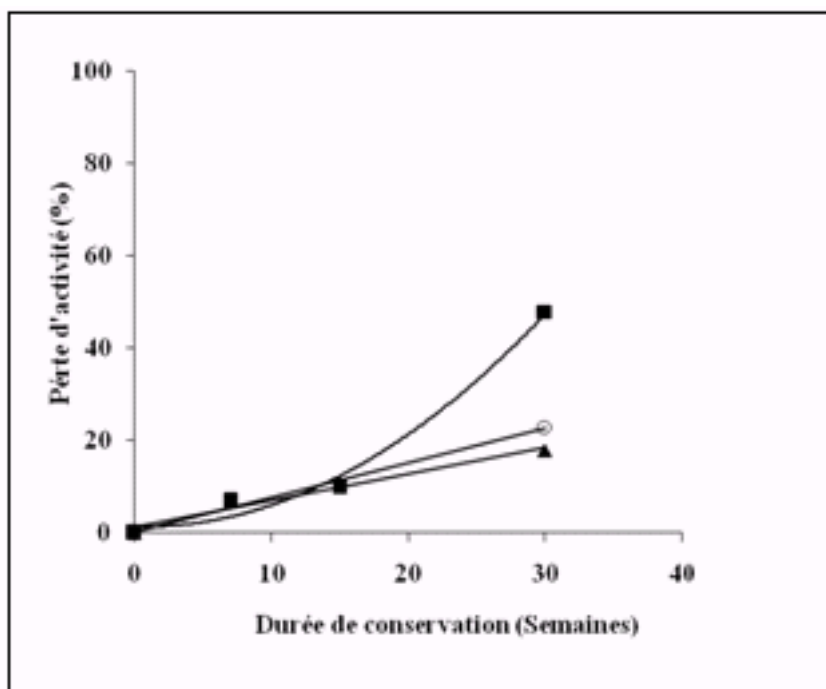
4.4- Effet des conditions de conservation sur l'activité coagulante des extraits purifiés

Dans les conditions de préparation de laboratoire, La conservation des extraits purifiés montre qu'à température ambiante variable de 18 à 22°C, toutes les protéases perdent progressivement leur activité en fonction du temps (Figure III.11). Après 15 jours de stockage, la protéase du figuier conserve environ 20% de son activité et 10% pour celle de l'artichaut et de la présure. Aux basses températures (4°C), la perte est moins prononcée, 45%(figuier), 25% (artichaut) et 18 % (présure) (Figure 12). L'origine de l'extrait demeure vraisemblablement un critère de conservation. LOPES et al.(1998) montre que la perte d'activité des extraits est très variable entre les espèces végétales étudiées.



Cynarase ■, ficine O, présure ▲

Figure III.11: Perte d'activité a température ambiante (20-22°C) des extraits purifiés Cynarase , ficine et de la présure



Cynarase ■, ficine O, présure ▲

Figure III.12: Perte d'activité pendant le stockage a 4°C de la Cynarase , ficine et de la présure .

CONCLUSION

Les extraits enzymatiques qui ont fait l'objet de notre étude sont depuis longtemps employés à l'état brut dans la fabrication des fromages traditionnels. Ils sont utilisés sous forme d'une macération de fleurs à maturité complète de l'artichaut cultivé ou d'une application directe de la sève brute de figuier dans la coagulation des laits bovins et de petits ruminants plus particulièrement les laits de chèvre et de brebis. Cette étude nous a permis d'évaluer les principales caractéristiques des enzymes purifiées par gel filtration en comparaison avec la présure, leur activité coagulante, leur composition en protéine et la caractérisation de leur activité en fonction de divers paramètres. Une meilleure connaissance des propriétés des protéases extraites a été établie pour une meilleure future application en fromagerie locale. L'inconvénient majeur de la pigmentation excessive des extraits a été levé par l'emploi d'un gel de purification et l'étude de la stabilité des enzymes dans diverses conditions (pH, température, concentration en enzyme et en CaCl_2 ajouté au lait) a montré des similitudes avec la présure. La purification des extraits bruts, l'élimination des pigments de coloration des préparations enzymatiques, une meilleure connaissance des propriétés coagulantes sont autant de facteurs qui contribuent à valoriser les laits plus particulièrement ceux produits par les petits ruminants des exploitations laitières privées, de l'agriculture de montagne et des régions du sud algérien.

À travers les résultats enregistrés, la similitude avec la présure traditionnelle en matière de propriétés biochimiques des enzymes a été démontrée sans pour autant égaler le caractère très spécifique de la Chymosine comme étant l'agent coagulant du lait par excellence. Aujourd'hui et pour des raisons philosophiques, religieuses et surtout pathologiques, les laitages portant le label Bio sont en pleine croissance, la biodiversité végétale est actuellement ancrée dans l'esprit des chercheurs et du consommateur et l'emploi des succédanés de la présure sous forme purifiée dans l'industrie du fromage est à notre avis imminente si toutes les restrictions technologiques sont levées.

CHAPITRE IV : ETUDE COMPARATIVE DE DEUX PROTEASES COAGULANT LE LAIT, EXTRAITES DE PROVENTRICULES DE POULET (*GALLUS GALLUS*) ET D'ESTOMACS DE LIMON (*SERIOLA SP.*).

INTRODUCTION

L'accroissement global de la demande en fromage a induit une augmentation importante de la production mondiale, accompagnée par une diversité de produits fromagers et la mise au point de fromages de plus en plus appétissants nécessitant ainsi l'utilisation de quantités de plus en plus importantes pour cet agent coagulant que le marché mondial ne peut facilement satisfaire (**RAMET, 1984**). La totale dépendance que connaît notre pays vis à vis de la présure a suscité la recherche de succédanés de la présure de différentes origines (animales, végétales, microbiennes) susceptibles de répondre aux besoins de la demande en agents coagulants bon marché.

Par ailleurs, les enzymes d'origine animale sont, pour la plupart, obtenues à partir de sous produits d'abattage, disponible et peu coûteuses. Néanmoins, ces pepsines gastriques possèdent des caractéristiques enzymatiques différentes comparées à la Chymosine. Bien que ces dernières aient fait l'éloge des chercheurs, les rares travaux réalisés à partir des années 80 sont restées au stade expérimental et n'ont pu aboutir à une application industrielle. Cependant, La revue de la littérature sur ce sujet, a montre la possibilité d'emploi des enzymes gastriques du poulet et du poisson dans la fabrication de certains fromages avec des conclusions plus ou moins satisfaisantes. Ainsi, Selon **GREEN (1972)**, **GORDIN et ROSENTHAL (1978)**, la pepsine de poulet a été employée comme substitut de présure et, le fromage Cheddar préparé avec cette protéase pouvait provoquer des défauts dans la saveur. En comparant la pepsine de porc, la pepsine de poulet, la pepsine bovine à la chymosine, **GREEN (1972)** signalait un certain nombre de différences durant la maturation du Cheddar. Cet auteur concluait que la pepsine de poulet n'était pas un bon substitut de la chymosine, provoquant une texture peu satisfaisante et un goût amer des fromages.

SCOTT(1979) rapportait qu'en 1973 – 1974, 50% des fromages en Israël étaient préparés à partir de pepsine de poulet. Selon FINDLAY et al. (1984), La pepsine extraite du proventricule de poulet permettrait la fabrication de Cheddar si la maturation n'excède pas trois mois. PAEZ DE LEON et al. (1995) avaient entrepris une étude sur une pepsine isolée à partir des estomacs de poulet. Ces auteurs ont utilisé la pepsine de poulet purifiée comme agent coagulant dans la production industrielle de fromages blancs pasteurisés. Par ailleurs, Les viscères d'organismes marins constituent une source abondante de molécules à partir desquelles il serait facile d'extraire des enzymes dont les propriétés et

les utilisations potentielles en industrie restent à déterminer (REECE, 1988). L'étude sur l'activité protéolytique des enzymes présentes dans les viscères de poissons a débuté dans le 19^e siècle (GILDBERG, 1988). Les différentes pepsines de poissons ne possèdent pas la même activité spécifique. Ainsi, la pepsine de *Perca fluviatilis* hydrolysera plus rapidement la fibrine que l'ovalbumine ou la gélatine. La protéase de l'estomac de *Seriola quinqueradiata* hydrolyse la caséine (PERES, 1981). Au Canada, une pepsine A a été isolée de la muqueuse gastrique du phoque et donne de bons résultats dans la fabrication de Cheddar (SHAMSUZZAMAN et HAARD, 1984). Une pepsine a été extraite à partir de la paroi interne de l'estomac de la morue d'Atlantique et les propriétés étudiées ont révélées qu'à 15°C, cette pepsine a coagulé le lait plus efficacement que la chymosine de veau et elle serait intéressante pour l'emprésurage à froid du lait dans la préparation du fromage Cheddar (BREWER et al., 1984). Une pepsine a été isolée à partir de la muqueuse gastrique de Roussette (*Scyliorhinus canicula*) et ses propriétés catalytiques sont similaires à celle de la chymosine de veau (GUERARD, 1987 ; GUERARD et LEGAL, 1989). Plusieurs pepsines de poissons, tels que : la sardine (NODA et MURAKAMI, 1981), le Capelin (GILDBERG et RAA, 1983), la morue d'Atlantique (BREWER et al., 1984), la morue polaire (ARUNCHALAM et HAARD, 1985) et le requin (NUNGARAY et LEGOFFIC, 1996) ont été purifiées et partiellement caractérisées. GILDBERG et al. (1990) ont purifiée trois pepsines obtenues à partir de la muqueuse gastrique de la morue d'Atlantique (*Gadus morhua*).

L'objectif de l'étude est d'explorer cette piste par une contribution à la connaissance plus approfondie de deux protéases à aspartate coagulant le lait extraites du système digestif du poulet et du poisson et les possibilités futures d'intégrer ces sous produits dans l'industrie du fromage. Ce travail illustre quelques propriétés de ces enzymes et discute des possibilités de leur utilisation dans la fabrication des laitages qui nécessitent une coagulation enzymatique.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel biologique

Deux sources de matières premières ont fait l'objet de notre étude pour l'obtention d'extraits coagulants (protéases). Ces matières premières sont représentées par Le pro ventricule ou le ventricule succenturié provenant du système digestif du poulet (*Gallus gallus*) et La muqueuse stomacale ou l'estomac provenant du système digestif du limon (*Seriola sp.*)(**Figure IV.1**) Le choix que peut présenter ces deux matières premières (avicole et marine) tient compte de certains critères, tels que : possibilité de se procurer facilement des quantités suffisantes de ces tissus pour isoler les protéases. Leur emploi comme substituts à la présure constituerait une piste pour la valorisation de ces coproduits d'abattage. Les échantillons (500 g) proviennent du complexe avicole de *Bordj El-Bahri* pour le poulet et de la pêcherie de *Bab El-Oued* pour les estomacs du limon.

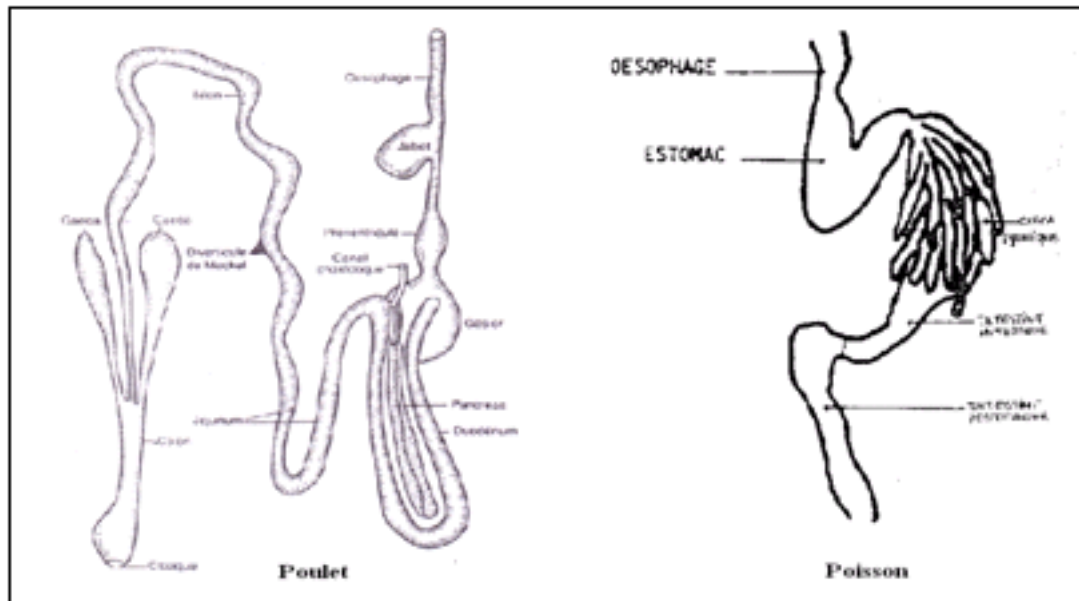


Figure : IV.1 Schéma du Système digestif du poulet et du poisson

I.1 Préparation de la matière première

Les matières premières d'origine avicole et marine, récupérées à l'état frais, sont acheminées au laboratoire dans une glacière. Elles sont aussitôt débarrassées de leurs contenus et de leurs graisses, lavées d'abord à l'eau courante puis à l'eau distillée, découpées en, conditionnées dans des sacs en plastique et enfin congelées à -18°C .

II. Extraction des enzymes

Dans le but d'optimiser le rendement d'extraction, les échantillons sont décongelés et broyés à l'aide d'un mixeur (type : appareil ménager) dans quatre solutions différentes : NaCl à 5% , tampon acétate (0,1 M ; pH 5) , tampon citrate (0,1 M ; pH 5) et tampon phosphate (0,1 M ; pH 5) . Un rapport de 1/3 (masse de la matière / volume de la solution d'extraction) est pris en considération (VALLES et FURET, 1977).

Ces préparations sont congelées à -18°C pendant 24 heures pour détruire les structures cellulaires et favoriser le passage du suc enzymatique dans la solution , décongelées à $+4^{\circ}\text{C}$ puis mises à macérer à 25°C pendant 3 à 4 heures. Les préparations macérées sont filtrées à travers une gaze afin d'éliminer les débris cellulaires grossiers. Le filtrat est centrifugé à 3200g pendant 15 minutes à 4°C (RIFAAT et al. 1970) puis filtré sur papier filtre .Le surnageant obtenu est ajusté à pH 5 pour la stabilisation de l'enzyme (Figure IV.2).

II.1 Activation de la pepsine avicole et marine

La pepsine est sécrétée dans la muqueuse gastrique des mammifères sous forme d'un précurseur inactif le « pepsinogène ». Ce dernier passe sous forme active la « pepsine » par une protéolyse limitée (GLICK et al., 1986 et 1989). L'activation de la pepsine d'origine

avicole et marine nécessite un abaissement de pH de la solution enzymatique jusqu'à pH 2 à l'aide de l'acide chlorhydrique concentré. Un temps de 15 minutes est suffisant pour cette activation, ensuite le pH est réajusté à 5 à l'aide de la soude pour la stabilité enzymatique (HAARD ET AL.,1982).

II.2 Clarification des extraits enzymatiques

Après activation, les extraits enzymatiques sont clarifiés par ajout de 1% (v/v) d'une solution de sulfate d'aluminium $Al_2(SO_4)_3$ 1M et 5% (v/v) d'une solution de sulfate disodique Na_2SO_4 1M, portés à 35°C. Après agitation et repos de 5 minutes à 35°C, le mélange est centrifugé à 2500g pendant 15 minutes puis filtré. Le filtrat constitue l'extrait enzymatique brut (EEB), ce dernier est congelé à -18°C et servira pour la suite de l'étude.

III. Méthodes de purification

III.1 Purification

Les techniques de pré purification par précipitation au sulfate d'ammonium a différents taux de saturation des extraits enzymatiques bruts, la purification par échange d'ions sur DEAE Cellulose A52 suivie d'une gel filtration sur G-75 sont analogues aux méthodes décrites dans le **Chapitre II**.

III.2 Analyse des extraits enzymatiques par la RP HPLC

Dans le but d'identifier les différentes formes possible de pepsine contenu dans l'extrait enzymatique, les fractions douées d'activité coagulante issues de l'échangeuse d'ions sont soumises à une HPLC en phase inverse (RP) sur colonne analytique à larges pores à l'aide d'un chromatographe liquide Shimadzu SCL-10A vp équipé d'un détecteur ultraviolet selon la technique décrite par BONFATTI et al.(2008) modifiée par nos soins.

. Les conditions chromatographiques sont : Colonne Nucleodur C_{18} (RP, 3,5 μ m, 300Å, 150×4.6 I.D), phase mobile: Acetonitrile – 0.1%Acide trifluoroacétique (TFA) en mode isocratique, débit: 1 ml/mn, détection à 214 nm. Pour mettre en évidence l'effet caseinolytique, les fractions identifiées sont récupérées par élution de l'extrait enzymatique sur colonne semi préparative (100×25 I.D). Des extraits sont mis à incuber en présence d'une gélose au lait en poudre écrémé constituée de (en g/l): extrait de levure:3, peptone:5, lait en poudre:1, et agar :15.

IV- Caractérisation des extraits coagulants bruts et purifiés

La méthodologie appliquée aux mesure d'activité enzymatique, de dosage des protéines et de caractérisation des extraits purifiés est analogue à celle développée dans les précédents chapitres (*Cf. Matériels et Méthodes - Chapitre II et III*)

RESULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS DES EXTRACTIONS

1- Quantité de matière première récupérée

Après prétraitement, la quantité totale de matière première fraîche récupérée est de l'ordre de 6,63 g et 10 g respectivement à partir d'un pro ventricule de poulet et d'un estomac de limon.

2- Détermination de la méthode d'extraction

Pour mieux caractériser les pepsines de poulet et de limon , nous avons jugé utile d'effectuer un essai comparatif en utilisant trois solutions tampons différentes à 0,1 M et pH 5 (pH de stabilité de l'enzyme) et une solution saline à 5 % . L'ensemble des extractions a été réalisé sur la masse fraîche. Le choix de la solution d'extraction adéquate est représenté par la mesure du temps de coagulation le plus court selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante.

Afin de pouvoir mieux comparer les deux extraits bruts, nous avons rapporté nos résultats à la même prise d'essai (50 g) . Les résultats obtenus sont représentés par le **tableau IV.1**. La solution tampon acétate semble nous donner le meilleur rendement pour les deux extraits bruts avec un temps de coagulation de 7,5 secondes pour la pepsine de poulet et 44 secondes pour la pepsine de limon. Cependant, nos résultats sont relatifs et restent propres à nos conditions expérimentales.

Tableau IV.1 : Temps de coagulation obtenus avec les différentes solutions d'extraction pour les extraits bruts de poulet et de limon.

Solutions d'extraction	Temps de coagulation (en secondes)	
	Poulet	Limon
Acétate	7,5	44
Citrate	11	59
Phosphate	9	50
NaCl (5%)	13	51

Dans la fabrication du fromage blanc pasteurisé, **BOHAK (1970)** cite par **PAEZ DE LEON et al. (1995)** a utilisé de la pepsine de poulet extraite à l'aide d'une solution de NaCl (28% concentration finale) additionnée de NaHCO₃. Pour **GUERARD (1987)**, le maximum d'activité est obtenu par macération de la muqueuse gastrique dans du tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH 7,3) tandis que **AMIZA et APENTEN (2002)** ont employé du tampon Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,3. **SANCHEZ-CHIANG et al. (1987)** ont noté que l'activité des extraits de poisson dépend de plusieurs facteurs à savoir la variété, l'espèce, l'état physiologique et la période de la pêche. Pour le poulet, **HASAN TEMIZ et al (2008)** ont effectué la macération des tissus du proventricule dans du NaCl à 10%.

Les extraits enzymatiques obtenus sont caractérisés par une couleur relativement très claire et une odeur peu prononcée , une activité coagulante de 13,33 UP/ ml pour l'EEB de poulet et 2,27 UP/ ml pour l'EEB de limon et un taux en protéines de 147.3 mg / ml et 35 mg / ml respectivement pour le poulet et le poisson ce qui confirme les valeurs très différentes des activités coagulantes. En dépit des résultats très différents en matière d'activité coagulante, **GILDBERG et al . (1990)** rapporte que les viscères des poissons constituent une source abondante de pepsine (2g/Kg).

II. PURIFICATION DES EXTRAITS COAGULANTS BRUTS

La précipitation au sulfate d'ammonium est totale a 50% de saturation pour les deux extraits enzymatiques. **EL-BELGTAGY et al. (2004)** obtient une précipitation optimale similaire dans l'intervalle de 40-60% de taux de saturation. Les précipités ainsi recueillis sont récupérés dans un minimum de tampon acétate de Na (0,1 M, pH 5), dialysés, concentrés ensuite soumis a la purification.

1- Purification de l'extrait coagulant obtenu à partir de pro ventricule de poulet

L'extrait enzymatique précipité au sulfate d'ammonium à 50% possède une activité de l'ordre 52,60% par rapport à l'activité initiale et un facteur de purification de l'ordre de 2,22 . Le profil de la chromatographie sur DEAE cellulose (A-52) du précipité au sulfate d'ammonium à 50% de saturation (1095mg) montre , d'après la **figure IV.3** , deux pics distincts. L'activité coagulante, constatée dans le deuxième pic, est éluee à une concentration en NaCl de 0,29 à 0,32 M. Cette étape a permis d'obtenir un facteur de purification de 12, 34 et un rendement en activité égale à 29,03%.

BOHAK (1969) a conclu que la chromatographie sur DEAE-cellulose du pepsinogene de poulet fait ressortir trois pics de protéines ; pic I à 0,15 M NaCl, pic II à 0,28 M NaCl et le pic III à 0,45-0,5 M NaCl. Toujours selon le même auteur, la rechromatographie sur DEAE-cellulose fait apparaitre que le matériel peptidique correspond au pic II élué entre 0,28 et 0,30 M de NaCl.

La chromatographie d'exclusion moléculaire de la fraction active issue de la précédente chromatographie a montré deux pics d'élution dont le premier est doué d'une activité coagulante alors que le second est inactif (**figure IV.4**). Des résultats très similaires ont été obtenus par **HASAN TEMIZ et al (2008)**, le rare auteur qui a repris les travaux sur les protéases coagulantes du proventricule.

La filtration sur gel a permis d'obtenir , d'après le **tableau IV.2**, un facteur de purification élevé de l'ordre de 20,57 , une activité spécifique également élevée (1,85 UP/mg protéine.) et un faible rendement en activité (8,06%). De plus 0,39 % des protéines totales ont été récupérées lors de cette étape de purification.

L'obtention d'un faible rendement en activité peut s'expliquer soit par une perte en activité, soit par une dilution de l'enzyme au cours de la purification. Ces pertes dans les d'activité observées dans les conditions expérimentales demeurent inévitables dans les processus de purification.

Cependant, **BOHAK (1969)** a obtenu après chromatographie sur gel filtration du pepsinogene de poulet un rendement en activité assez élevé (61,64%) et une activité spécifique égale à $3,5 \times 10^3$ U /mg de protéine.

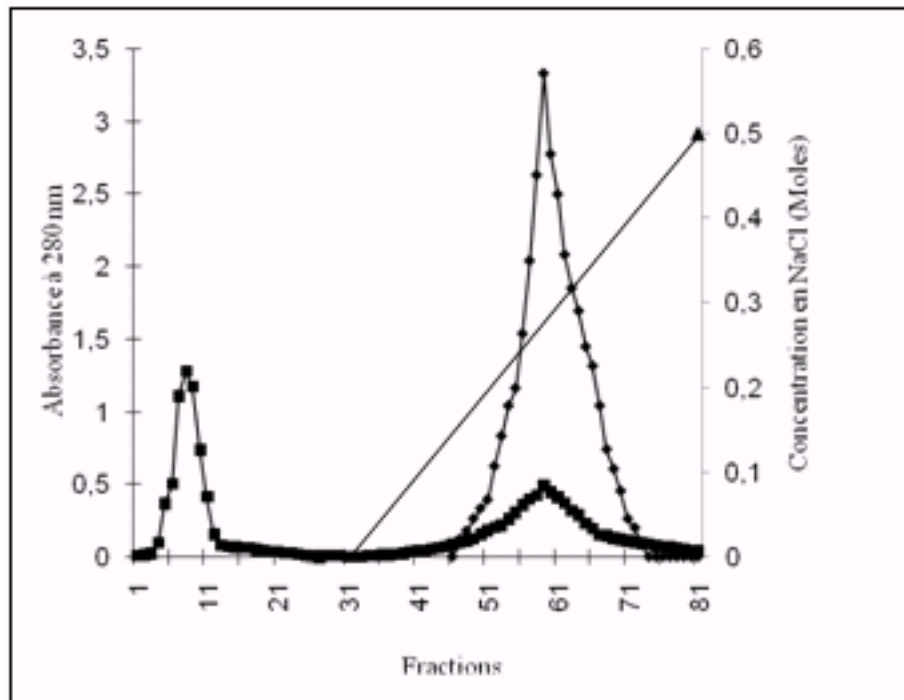
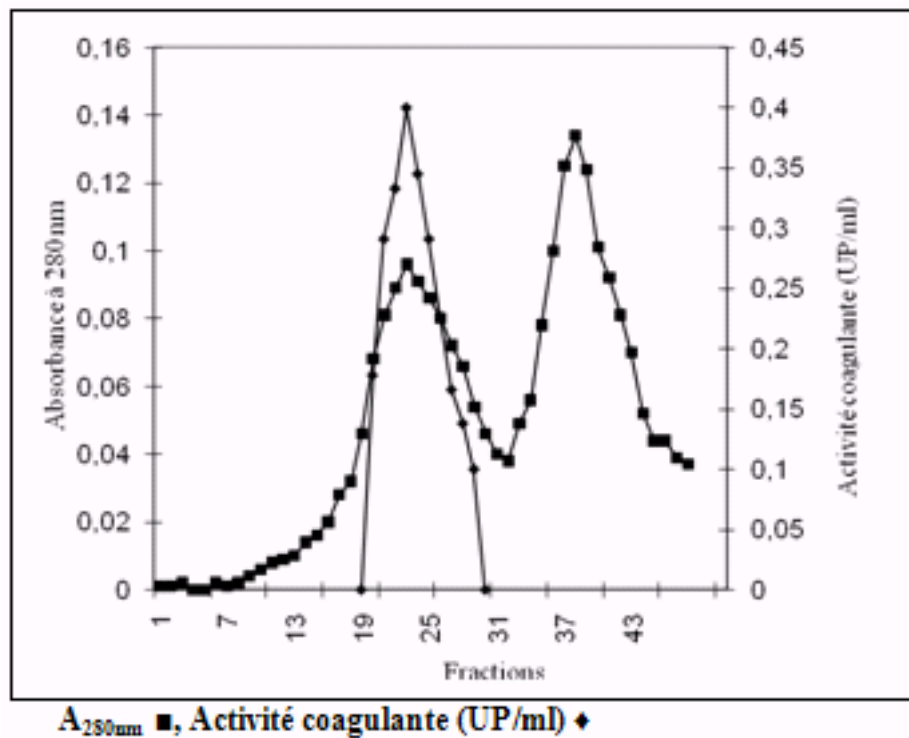


Figure IV. 3 : Profil d'élution sur DEAE-cellulose (A52) de l'extrait coagulant de poulet après précipitation au sulfate d'ammonium à 50% de saturation. (colonne 1x20cm), tampon d'élution acétate (0,1 M , pH 5), gradient NaCl (0-0,5M), débit :54 ml/h , fraction :1,8 ml). A_{280nm} ■, Activité coagulante (UP/ml) ◆, NaCl ▲



A_{280nm} ■, Activité coagulante (UP/ml) ◆

Figure IV. 4 : Profil d'élution sur sephadex G-75 de la fraction active de poulet, issue de l'échangeuse d'anions. (Colonne (1,5 x 30cm), tampon d'élution acétate (0,1 M ; pH5), débit : 14,4 ml/h, Fraction : 1,2 ml).

Tableau IV.2 : Résultats des étapes de purification de l'extrait purifié de poulet.

Paramètres de purification	Étape	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP /mg)	Rendement en activité (%)	Facteur de purification
EEB (poulet)		413,33	4566,3	0,09	100	1
50% de saturation		217,39	1095	0,20	52,60	2,22
Echangeuse d'anions		120	108	1,25	29,03	12,34
Filtration sur gel		33,33	18	1,85	8,06	20,57

2- Purification de l'extrait coagulant obtenu à partir de l'estomac de limon

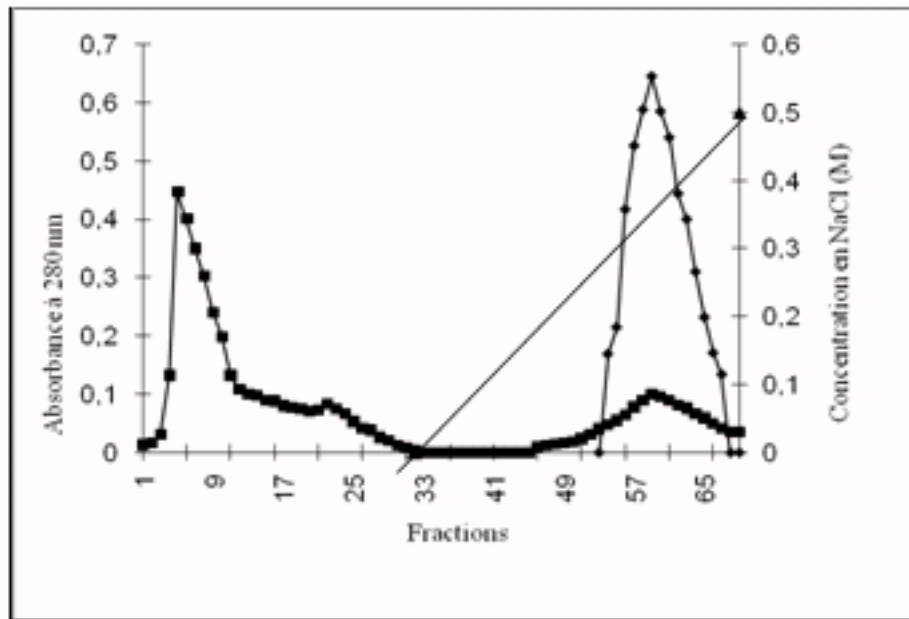
La pepsine de limon, après précipitation au sulfate d'ammonium à 50% de saturation, présente une activité de l'ordre de 63,09% par rapport à l'activité initiale et un facteur de purification égale à 5,03 (Tableau IV.3).

Le profil de la chromatographie par échange d'anions sur DEAE-cellulose (A 52) , illustré par la **figure IV.5**, montre trois pics dont un seul (le troisième) est doué d'une activité coagulante . La pepsine de limon est éluée avec le gradient NaCl à une concentration égale à 0,35-0,39 M.

Nous avons enregistré au cours de cette étape une augmentation du facteur de purification de l'ordre de 13,38. Ce dernier est légèrement plus élevé que celui obtenu avec la pepsine de poulet (12,34). Le rendement en activité est de 34,68 % alors que celui obtenu avec la pepsine de poulet est de l'ordre de 29,03%.

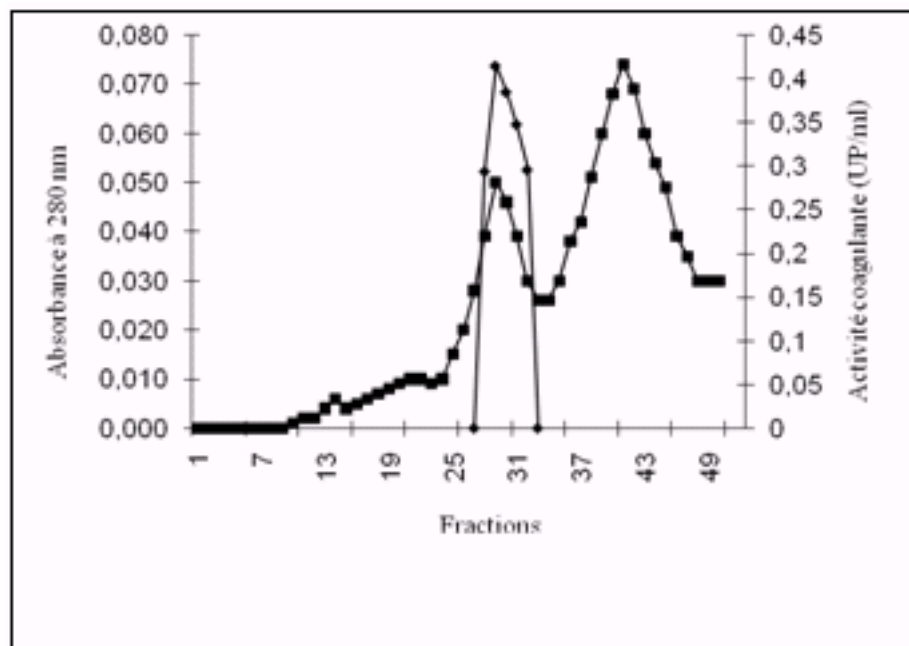
Le profil de la chromatographie d'exclusion moléculaire sur sephadex G-75 de la fraction active, issue de l'échangeuse d'anions, montre trois pics d'élution (**Figure IV.6**). Le test d'activité indique que seul le deuxième pic est actif.

Un facteur de purification de l'ordre de 24,74 a été obtenu avec une activité spécifique assez élevée (1,61 UP/mg de protéine.) et on constate que le rendement en activité baisse jusqu'à atteindre une valeur de 13,10 % .Ce dernier est plus élevé que celui obtenu avec la pepsine de poulet (8,06 %). De plus la gel filtration a permis de récupérer 0,53 % des protéines totales.



A_{280nm} ■, Activité coagulante ◆, NaCl ▲

Figure IV. 5 : Profil d'élution sur DEAE-cellulose (A52) de la pepsine de limon après précipitation au sulfate d'ammonium à 50 % de saturation . (Colonne (1 x 20 cm), tampon d'élution acétate (0,1M ; pH 5), gradient NaCl 0-0,5M, débit : 54ml/h, fraction : 1,8ml).



A_{280nm} ■, Activité coagulante ◆

Figure IV. 6 : Profil d'élution sur sephadex G-75 de la fraction active de limon, issue de l'échangeuse d'anions. (Colonne (1,5 x 30cm), tampon d'élution acétate (0,1 M ; pH5), débit : 14,4 ml/h, Fraction : 1,2 ml).

Tableau IV.3 : Résultats des étapes de purification de l'extrait purifié du poisson.

Paramètres de purification	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP /mg)	Rendement en activité (%)	Facteur de purification
EEB (Poisson)	70,45	1085	0,065	100	1
50 % de saturation	44,44	136	0,44	63,09	5,03
Echangeuse d'anions	24,43	28,08	0,87	34,68	13,38
Filtration sur gel	9,23	5,74	1,61	13,10	24,74

BELTAGY et al. (2004) ont rapporté, après purification sur gel filtration d'une protéase acide de poisson (*Tilapia nilotica*), que le pic actif présente un facteur de purification égale à 18,36 avec une activité spécifique de l'ordre de 1,10 U/mg protéines et un rendement en activité de 12,14 %.

Plusieurs auteurs ont adopté sur les extraits précipités issus de diverses espèces de poissons un protocole identique de purification. Selon l'origine de l'espèce, des résultats différents obtenus dans les activités on marque leurs observations résumées dans le tableau suivant.

Tableau IV.4 : Efficacité comparée de la purification de quelques protéases gastriques du poisson

References	Especies de poissons	R ^{dt}	Precipitation	Techniques de purification
GILDBERG and RAA (1983)	Poisson capelin	14.4	(NH ₄) ₂ SO ₄	DEAE-cellulose (Whatman 52),
GILDBERG et al. (1990)	Morue de l'Atlantic	34		CM-cellulose (Whatman DE 52),
NODA et MURAKAMI (1981)	Sardine	5,3		gel filtration S-Sepharose
TANJI et al. (1988)	Thon bleu Merlan	69		CM-cellulose (1 or 2x), gel filtration (2x DEAE cellulose, gel filtration, Q-Sepharose, Mono Q HR 5/5
SANCHEZ-CHIANG et PONCE (1981)	Truite	13,6		DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex A-50 Polylysine-Sepharose, DEAE-Sephacel, Sephadex G-200, DEAE-Sepharose
TWINING et al. (1983)		3,5		

3- Profil de la RP-HPLC des extraits purifiés du poulet et du poisson

Il est clair qu'à travers les schémas de purification, les rendements de purification de la protéine dépend non seulement de la technique employée mais également de la répétition par laquelle l'élution de la fraction active a été soumise. De nombreux travaux rapportés par **BONFATTI et al. (2008)** ont mis en évidence l'intérêt des techniques de séparation des bio polymères a poids moléculaire moyen a élevé telles que les protéines du lait. A Cet effet, la RP-HPLC représente une méthode d'analyse rapide, donnant des séparations de hautes résolutions suivies de résultats très reproductibles. A partir de ces observations, les fractions actives issues de la purification par échange d'ions ont été éluées a travers une colonne HPLC phase inverse greffée d'OctaDecylSulfone (C18) a larges pores (300Å) pour une meilleure résolution des protéines enzymatiques. Le profil chromatographique de la **figure IV.7** montre 2 pics distincts pour les 2 extraits avec des temps de rétention respectifs

de 3,29 et 5 mn. Ces données très comparables laissent supposer que les fractions éluées correspondent bien à la pepsine I et II et dont la première fraction est douée d'une forte activité protéolytique sur gélose à base de lait écrémé (**Figure IV.8**). Les pics 3 et 4 de l'éluât du poulet pourraient être à notre avis de petits peptides non actifs contaminants de l'extrait. Les résultats enregistrés semblent pouvoir conclure que les techniques de purification employées dans notre présent travail sont partielles mais suffisantes pour caractériser les extraits coagulants et leur utilisation en fromagerie. Par ailleurs, l'électrophorèse de la fraction active après une gel filtration de l'extrait brut précipité du poisson (**Figure IV.9**) a montré une seule bande électrophorétique confirmant l'homogénéité protéique de l'extrait au même titre que les profils issus de l'exclusion moléculaire (**Figure IV.4 et IV.6** précédentes) avec la présence d'un seul pic actif.

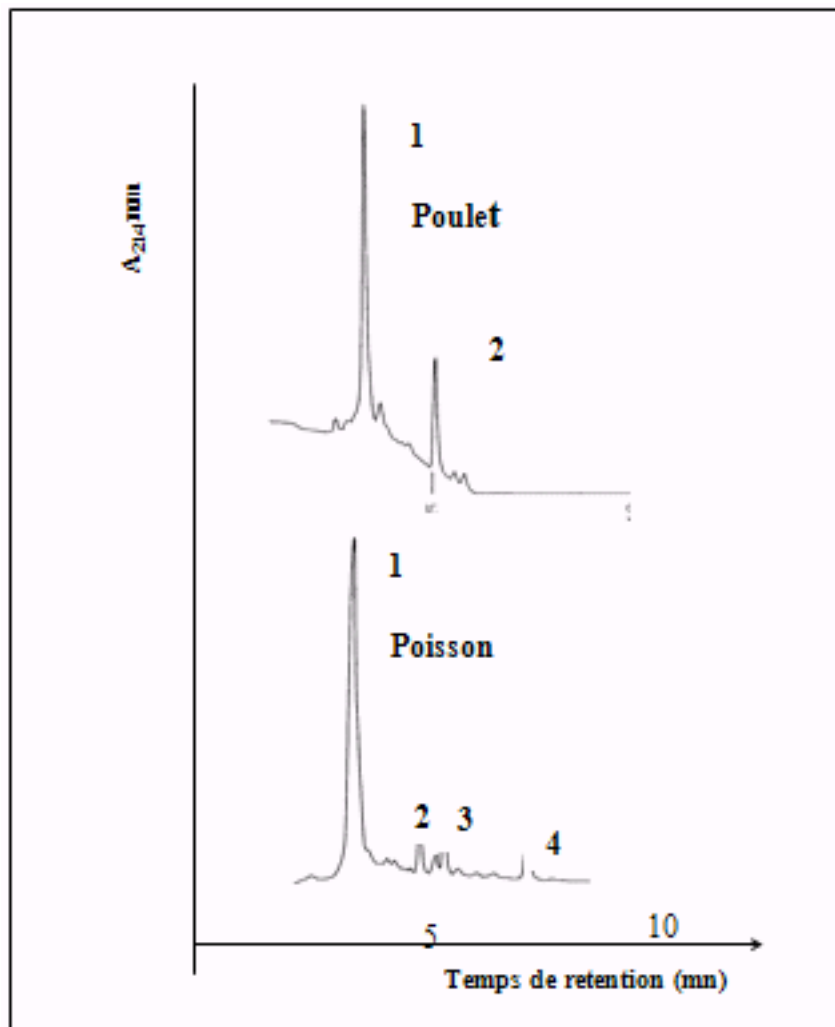
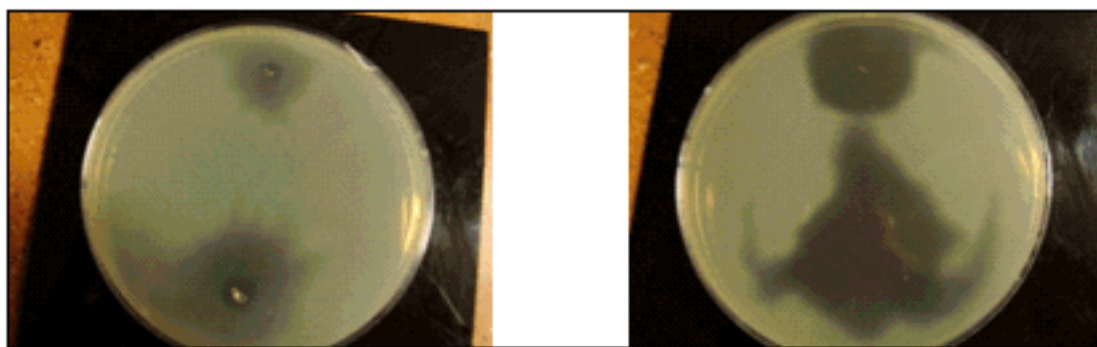


Figure IV.7 : Profil chromatographique RP- HPLC de la fraction active obtenue par échangeuse d'ions des extraits enzymatiques du poulet et du poisson. (Colonne ODS C₁₈(RP, 3,5 μm, 300Å , 150×4.6 I.D), phase mobile: Acetonitrile – 0.1%Acide trifluoroacétique (TFA) en mode isocratique, débit: 1 ml/mn, détection à 270 nm. (Pic 1 à 4 : Pepsine I à IV)



A

B

Figure IV.8: Mise en évidence de l'effet caseinolytique de la fraction du pic 1 (**A** : Pepsine Poisson, **B** : Pepsine Poulet) obtenues après purification par la RP HPLC préparative colonne ODS C₁₈, 150×25 I.D) sur milieu gélosé à base de lait écrémé.

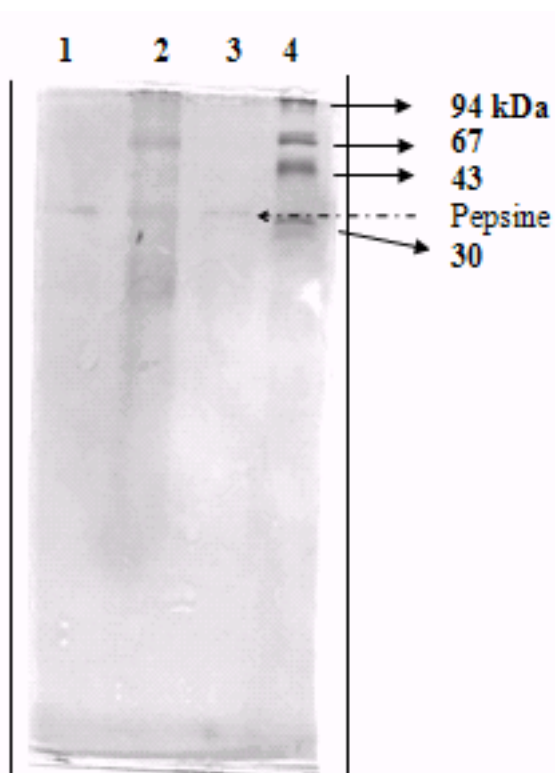


Figure IV.9: Profil électrophorétique PAGE-SDS de l'extrait enzymatique brut et purifié d'estomac de poisson (Limon)

(lignes 1 et 4 : extrait enzymatique purifié, ligne 2 : extrait enzymatique brut , ligne 4 : protéines marqueurs).

III. Caractérisation des extraits coagulants purifiés et de la présure

III.1 Activité coagulante comparée des extraits coagulants du poulet , de limon et de la présure en fonction de la température du lait , du pH, de la concentration en CaCl₂ et de la concentration en enzyme

La détermination de la température optimale d'activité des trois préparations coagulantes a été réalisée en mesurant le temps de coagulation à différentes températures du lait allant de 25 à 60 °C. La **figure IV.10** indique un comportement légèrement différent des enzymes étudiées. En effet , l'optimum d'action pour la pepsine purifiée de poulet est obtenu à une température du lait égale à 40°C par contre, celui de la pepsine purifiée de limon et de la présure est observé à une température égale à 45 °C. La pepsine de poulet et celle de limon sont complètement inactives à une température du lait égale à 55°C contre 60°C pour la présure commerciale.

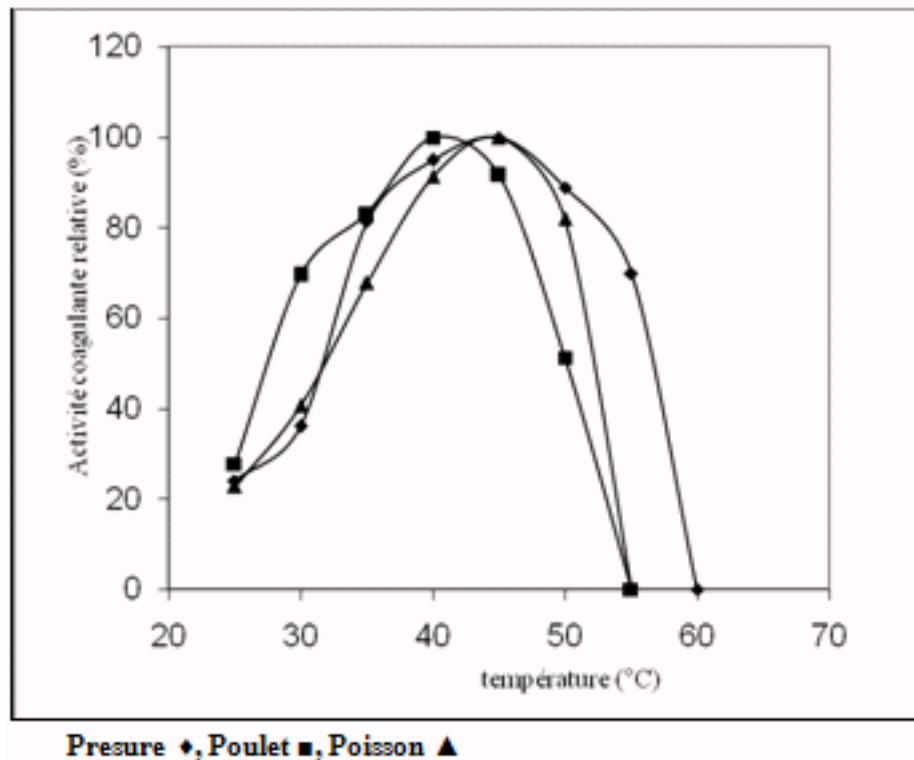


Figure IV.10 : Activité coagulante des extraits purifiés du poisson , du poulet et de la présure en fonction de la température du lait .

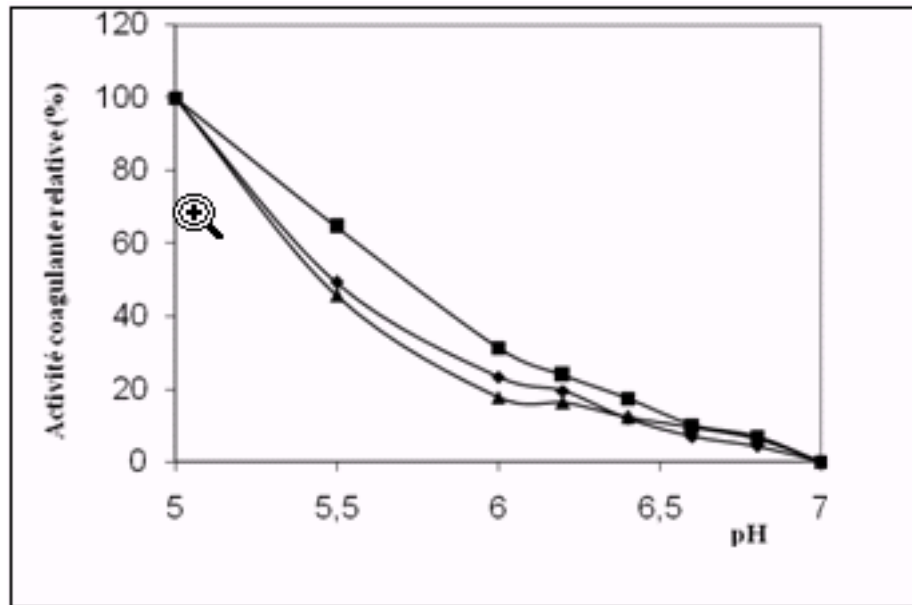


Figure IV.11 : Activité coagulante des extraits purifiés du poisson, du poulet et de la présure en fonction du pH du lait.

Selon **GARNOT et MARTIN (1980)**, la présure présente une activité coagulante à une température voisine de 40°C. Pour **TAVARES et al. (1997)**, une coagulation non significative du substrat de Berridge est observée avec des enzymes gastriques et la présure standard dans l'intervalle de pH compris entre 4 et 6. Les travaux de **SIBOUKEUR et al. (2005)** sur l'activité de la pepsine extraite de la muqueuse gastrique du dromadaire ont montré que l'élévation de la température mesurée entre 30 et 45°C s'accompagne d'une diminution du temps de floculation du lait camelin. **D'AMBROSIO et al. (2003)** ont montré que l'activité protéolytique des extraits enzymatiques de crustacées est optimale à 55-60°C, **HAARD et al. (1982)** ont signalé que la température optimale de coagulation pour la pepsine de poisson est de 30°C alors que pour la pepsine bovine et porcine, elle se situe entre 30-50°C. Les coagulases d'origine végétale et microbienne présentent en général une température optimale d'activité plus élevée par comparaison aux protéases d'origine animale. Plusieurs auteurs ont observé une stabilité des protéases végétales jusqu'à 80°C.

GOURSAUD (1999) a indiqué une température optimale d'action pour les trois préparations coagulantes fongiques : *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* et *Endothia parasitica* entre 52-62°C comme il a été démontré dans le Chapitre II pour les protéases microbiennes. Il faut remarquer que le terme présure commerciale est très générique du fait que ces dernières années, plusieurs préparations sont mises sur le marché avec des propriétés parfois très différentes.

L'influence du pH du lait sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques est illustrée par la **figure IV.11**. Les trois préparations enzymatiques étudiées présentent un comportement analogue vis à vis du pH du lait. Une activité relativement importante est constatée à pH 5,0 ; au-delà de cette valeur, l'activité chute. À pH 6,8, l'activité des trois extraits coagulants est minimale et ne représente que 7,06 %, 6,29 % et 4,33 % respectivement pour la pepsine de poulet, la pepsine de limon et la présure. Ces trois préparations sont complètement dénaturées à pH 7. Des résultats similaires ont été observés par **TAVARES et al. (1997)** sur des extraits enzymatiques de thon et de la morue.

GARNOT et MARTIN (1980) ont signalé que le pH d'activité de la présure animale est compris entre 5,3 et 6,3 ; son optimum d'action est à pH 5,8, elle est inactivée à pH 7,5 et dénaturée à pH 8,0. Selon ces mêmes auteurs, la vitesse d'action de la présure et de la pepsine bovine croît en fonction de l'abaissement du pH. Au pH 6,8, l'activité de ces deux enzymes est minimum.

Selon **RAMET (1990)** , l'abaissement du pH de 7,0 à 5,2 provoque la diminution du temps de coagulation . En effet, l'acidification du lait favorise la réaction d'agrégation par suite à la diminution de la stabilité des micelles , liée à la neutralisation des charges négatives et à la libération d'ions calcium.

HAARD et al. (1982) rapportent que le pH maximal de coagulation des deux pepsines poisson et porcine se situe dans l'intervalle de pH 6,4-6,6, celui de la pepsine bovine est à 6,8.

D'AMBROSIO et al. (2003) ont indiqué une activité optimale dans l'intervalle de pH compris entre 6,5-7,5 pour la pepsine purifiée d'un crustacé le *Munida* . Bien auparavant, **SHAMSUZZAMN et HAARD (1983)** ont observe que le pH optimal d'activité des extraits de mammifères marins se situe vers 6,6 pour la fabrication du cheddar.

l'influence du calcium sur l'activité coagulante des extraits purifiés de poulet et de limon comparée à la présure animale a été étudiée en faisant varier sa concentration dans le lait de 0,01 à 0,09 M .

Les résultats indiqués dans la **figure IV.12** montrent que l'activité coagulante augmente avec la concentration en CaCl_2 du lait. Nous constatons que l'optimum d'activité pour la préparation coagulante purifiée de poulet est obtenu à 0,02 M tandis que pour l'extrait enzymatique de limon et de la présure animale, l'optimum d'activité est observé à 0,04 M. Au delà de ces deux optimums, l'activité coagulante baisse par un effet inhibiteur de l'ion calcium. cet effet est plus marqué avec l'extrait coagulant de poulet.

Selon **BRULE et LENOIR (1990)**, l'addition du calcium soluble entraîne une augmentation de la teneur en phosphate de calcium colloïdal lequel semble être le facteur déterminant de l'aptitude du lait à la coagulation par la présure. Dans une étude comparative des pepsines de poissons et des mammifères (porc et bovin), **HAARD et al., (1985)** situent l'action coagulante optimale dans le même intervalle de concentration en CaCl_2 soit 0,03 à 0,05 M.

L'addition au lait de chlorure de calcium, pratique courante en fromagerie , a pour effet de réduire le temps de coagulation et d'accroître la fermeté du coagulum , cette influence n'est pas seulement liée à l'augmentation des teneurs en calcium ionique mais intervient sur l'abaissement du pH , réde 31%uisant ainsi la stabilité micellaire (**ECK , 1990**) . En ajoutant 10Mm de CaCl_2 , **EL-BELTAGY (2004)** accroit l'activité de la pepsine de *Tilapia nilotica* de 31%.

GARNOT et MARTIN (1980) ont noté que l'activité optimale pour la présure animale a été constatée pour une concentration en CaCl_2 de l'ordre de 0,02 M.

L'influence de la concentration en enzyme sur l'activité coagulante a été déterminée en faisant varier la quantité d'extrait de 0,02 à 0,2 mg/ml . La **figure IV.13** montre que l'activité coagulante relative augmente quand la quantité d'extrait pour les trois préparations augmente. Cependant, dans l'intervalle de concentration choisie, on ne note pas de pallier correspondant à une concentration saturante en enzyme. Il est connu que l'augmentation de la concentration en enzyme provoque une réduction du temps de coagulation du lait cause

par l'accroissement de la cinétique d'hydrolyse de la fraction κ de la caséine mais sans pour autant manifester une proportionnalité directe entre les valeurs (LOPEZ et al. 1998).

Nous constatons d'après cette même figure que la pepsine purifiée de poulet et celle de limon ont un comportement similaire vis à vis de la concentration en enzyme. Seulement, leur activité coagulante relative est légèrement inférieure à celle de la présure animale.

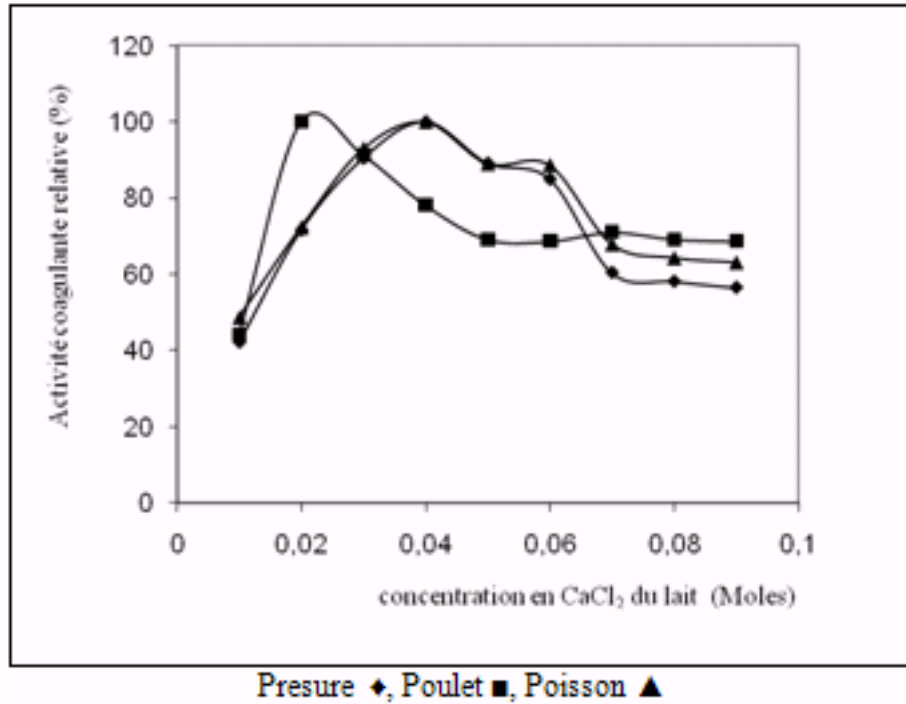


Figure IV.12 : Activité coagulante des extraits purifiés du poisson , du poulet et de la présure en fonction de la concentration en CaCl_2 du lait

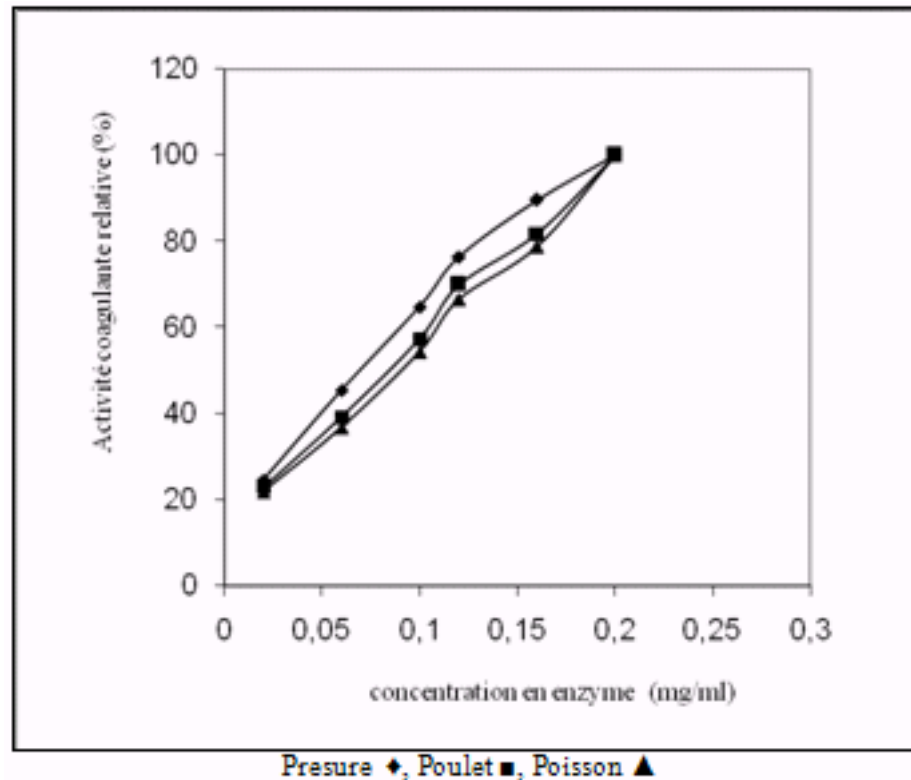


Figure IV.13 : *Activité coagulante des extraits purifiés du poisson, du poulet et de la présure présure en fonction de La concentration en enzyme.*

Les travaux de **GARNOT et MARTIN (1980)** et **GOURSEAUD (1999)**, ont montré que l'activité coagulante relative de la présure croît linéairement en fonction de sa concentration lorsque celle-ci est faible, ce qui correspond aux doses employées en fromagerie. Ceci confirme nos résultats en ce qui concerne le comportement de la présure.

CASTILLO et al. (2000) montre par une analyse multi factorielle que les paramètres température, pH et concentration en enzymes affecte le temps de coupe (T_{cut}) du caille du lait de chèvre. Auparavant, **ELEYA et al.(1995)** a fait les mêmes observations et remarque que la concentration en enzyme est déterminant dans l'évaluation du temps de gélification. En reprenant les travaux sur le lait de vache, **NAJERA et al.(2002)** montre que l'effet combine du pH, de la température et de la concentration en $CaCl_2$ affecte d'une manière significative la coagulation et la fermeté du gel présure.

III.2. Etude de la stabilité thermique des extraits coagulants purifiés et de la présure

La stabilité thermique des deux extraits coagulants purifiés (poulet et limon) comparée à celle de la présure animale a été étudiée en maintenant, pendant 30 minutes, ces préparations enzymatiques à des températures allant de 30 à 60 °C.

D'après les résultats illustrés par la **figure IV.14**, nous remarquons que l'activité coagulante des trois préparations enzymatiques (présure, poulet et limon) est relativement stable dans l'intervalle de températures compris entre 30 et 40 °C. Au delà de cette valeur, l'activité diminue progressivement. Nous constatons également que la présure et la pepsine purifiée de limon sont complètement dénaturées à une température égale à 55 °C, par contre, la dénaturation de l'enzyme de poulet a lieu à 60°C.

ALAIS (1984) a noté que lorsque la température s'élève au dessus de 50 °C, la dénaturation de la présure devient sensible. Les extraits de poissons (*tilapia nilotica*) conservent plus de 50% de leur activité entre 50 et 60°C pendant 30 mn et présentent une bonne stabilité entre pH 2 et 6 (EL-BELTAGY et al. 2004). Auparavant, GUÉRARD (1987), en caractérisant la pepsine de la roussette fait remarquer que la faible résistance thermique de la pepsine coagulante, comparativement à la Chymosine d'une part et à certaines protéases fongiques d'autre part, peut permettre d'envisager une inactivation thermique des enzymes après formation du coagulum et prévenir ainsi les défauts engendrés lors de l'affinage des fromages. Ces propriétés permettent donc d'envisager, sous certaines conditions, une utilisation de cette enzyme en industrie fromagère.

L'étude de la stabilité au cours de la conservation a été réalisée par l'entreposage des extraits purifiés de poulet et limon à +4°C et à -18°C. l'activité coagulante résiduelle, exprimée en pourcentage par rapport à l'activité coagulante initiale, a été évaluée périodiquement. Les résultats illustrés par les figures IV.15 et IV.16 indiquent une baisse d'activité au delà de 21 jours de conservation à +4 °C et au 28^{ème} jour, l'activité coagulante résiduelle des pepsines purifiées de poulet et limon est de 80,43 %, 70,44 % respectivement. Au delà de cette période, l'activité coagulante continue à baisser progressivement.

Cependant, ces deux extraits purifiés ne montrent aucune baisse d'activité à -18°C au bout de 56 jours ; au 84^{ème} jour, l'activité coagulante résiduelle pour ces deux extraits est de 66,39 % et 57,51 % respectivement pour la pepsine purifiée de poulet et limon.

Toutefois, il est à remarquer que les préparations commerciales sont soit stabilisées par lyophilisation ou diluées dans du solvant Polyéthylène glycol lorsque les extraits sont sous forme liquide.

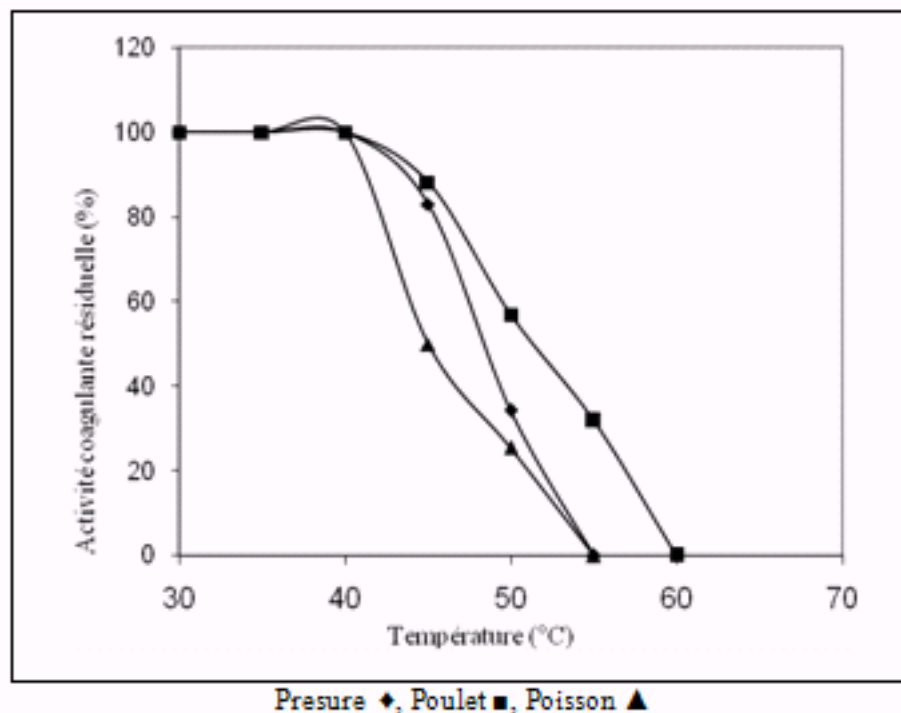
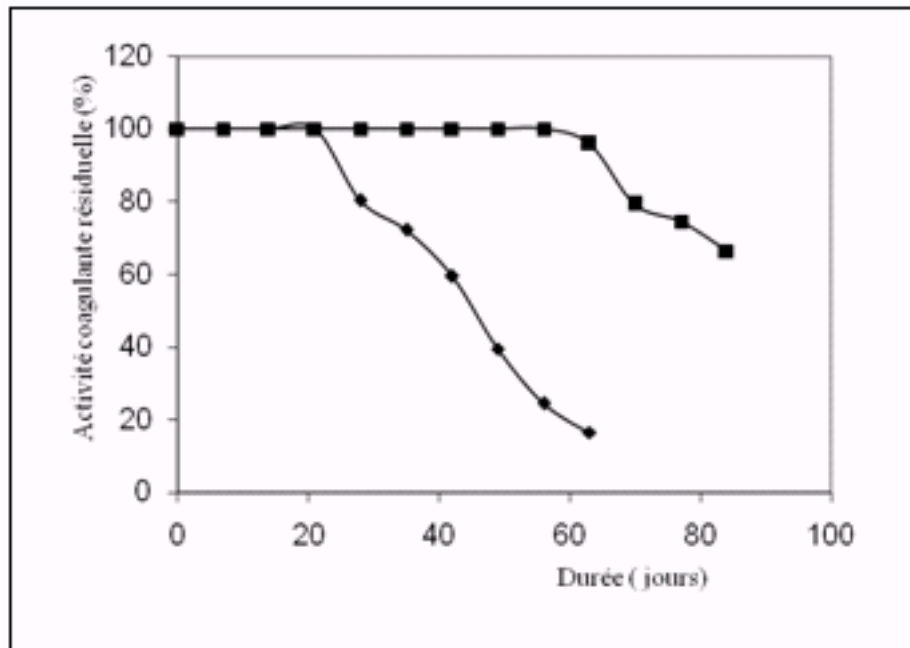
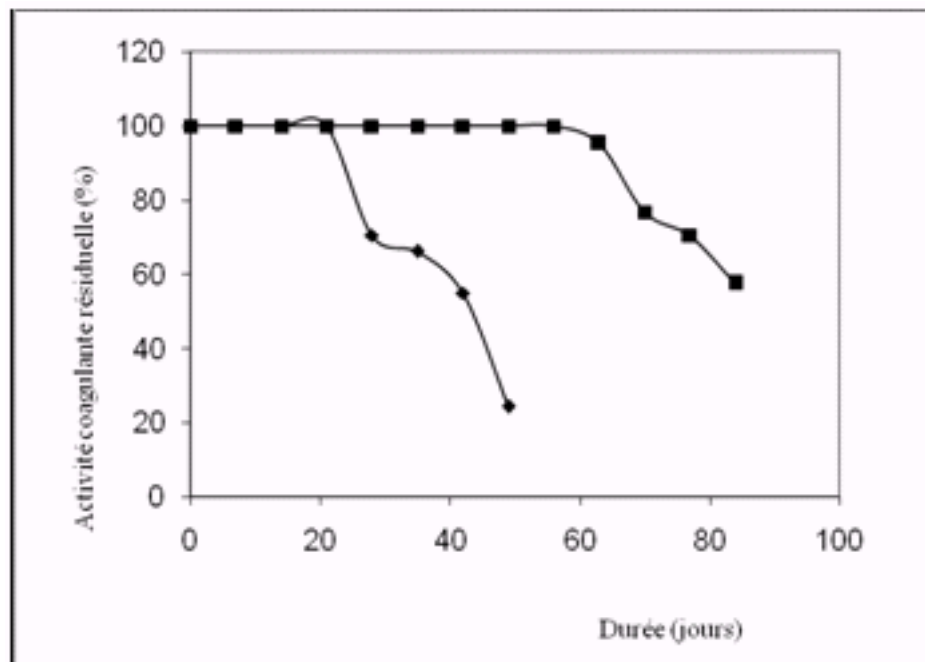


Figure IV.14 : Stabilité thermique des extraits purifiés et de la présure après 30 minutes d'incubation.



de conservation. +4 ♦, -18°C ■

Figure IV.15 : Stabilité de l'extrait purifié de poulet en fonction du temps



+4 ♦, -18 ■

Figure IV. 16 : Stabilité de l'extrait purifié de limon en fonction du temps de conservation.

III.3. Activité protéolytique des extraits purifiés et de la présure

L'activité protéolytique, des extraits coagulants purifiés de poulet et limon par comparaison à la présure animale, a été étudiée selon la méthode de **GREEN et STACKPOOLE (1975)**

en utilisant la caséine du lait comme substrat. La coupure spécifique de la caséine au cours de la première étape de la coagulation du lait est suivie d'une protéolyse générale plus lente (**GRIPON et al., 1980**). Ce phénomène recherché dans la fabrication des fromages est développé par des enzymes coagulantes de référence comme la Chymosine. Selon **PAQUET (1977)**, l'activité protéolytique de la présure de veau sur la caséine K développe une cinétique durant les 20 premières minutes de la coagulation correspondant à la réaction primaire crachoteuse par une pente initiale. Après rupture de la liaison spécifique Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la chaîne polypeptidique, l'évolution de la protéolyse est très ralentie caractérisée par une absence de libération de l'azote non protéique.

Dans nos conditions d'expérience sur l'activité protéolytique des extraits purifiés sur une solution de caséine, la cinétique de libération des protéines solubles (exprimée en tyrosine) semble suivre la même allure que la présure mais avec une protéolyse beaucoup plus prononcée des pepsines. L'évolution de l'azote non protéique au cours de l'hydrolyse enzymatique a été rapportée par la **figure IV.17**. Les résultats obtenus montrent que l'activité protéolytique de la présure est moins importante que celle des pepsines purifiées de poulet et limon. En effet, nous pouvons constater deux phases, la première a lieu entre 10 et 90 minutes d'incubation, où le taux d'azote non protéique augmente progressivement, ceci laisse supposer qu'il y a eu hydrolyse des protéines et libération des acides aminés libres ainsi que des peptides de faible poids moléculaire. La seconde phase correspond à un pallier (entre 90 à 180 minutes pour la pepsine de limon et 150 à 180 minutes pour la pepsine de poulet), durant laquelle la protéolyse générale est relativement stable. **KRAUSE et al.(1998)** rapporte que la pepsine ((EC. 3.4.23.1) possède une activité protéolytique intermédiaire entre la Chymosine et les enzymes fongiques sur l'ensemble des fractions de la caséine.

Il est admis que Les enzymes microbiennes et végétales manifestent une forte activité protéolytique par comparaison aux protéases d'origine animale. En effet, selon certains auteurs (**ALAIS ,1984 ; PREETHA et BOOPATHY,1997 ; KRAUSE et al. 1998**), les enzymes fongiques manifestent une activité plus grande que celle de la présure et de la pepsine.

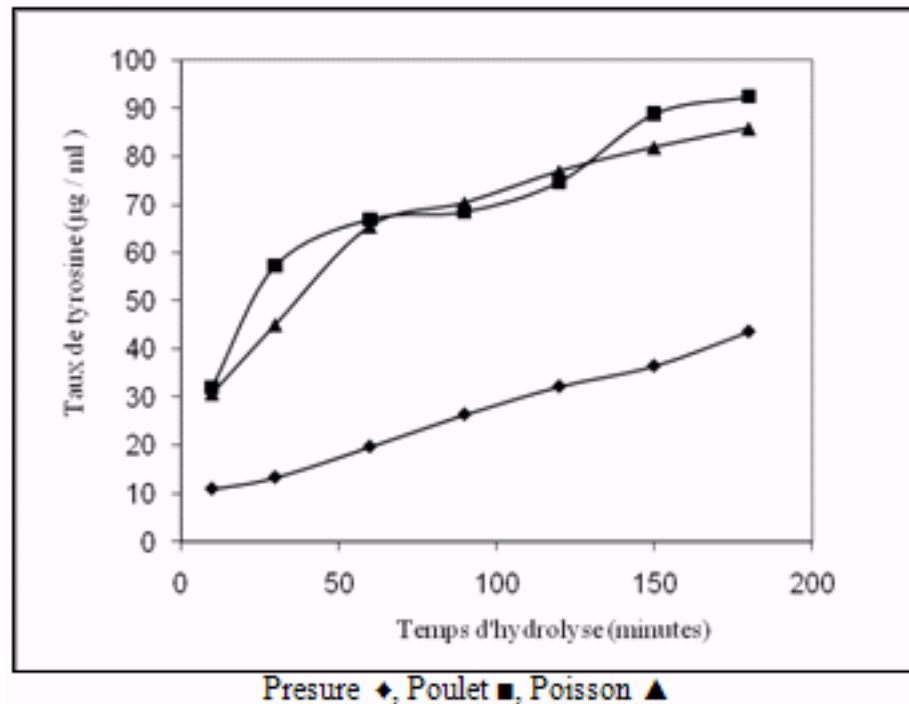


Figure IV.17 : Activité protéolytique des extraits purifiés et de la présure en fonction du temps de réaction..

CONCLUSION

Les pro ventricules de poulet présentent l'avantage d'être obtenus en grande quantité au cours de l'année. Par contre les estomacs de limon restent dépendants de la période de reproduction du poisson.

L'analyse des résultats relatifs aux extractions nous a permis de constater que la force coagulante optimale pour les deux préparations brutes est obtenue avec la solution tampon acétate sodique. Par rapport à la présure commerciale dont la force est de 1/10000, les résultats obtenus lors de nos essais restent faibles (1/3200 pour l'extrait de poulet et 1/545 pour l'extrait de limon). Comme toutes les pepsines animales douées d'activité protéolytique, ces enzymes demeurent prédestinées en technologie fromagère.

Cependant, la présure représente un extrait purifié dont le taux en protéines totales (1,23 mg/ml) représente directement le taux d'enzyme en solution. L'extrait brut de poulet présente la plus forte activité (13,33 Up/ml) et une concentration en protéines égale à 147,3 mg/ml. L'extrait brut de limon, quant à lui présente une activité égale à 2,27 Up/ml et une concentration en protéines totales, environs 4 fois plus petite que celle du poulet (35 mg/ml).

L'analyse des résultats relatifs aux purifications montre que la précipitation des protéines, contenues dans les extraits bruts de poulet et limon au sulfate d'ammonium à différents pourcentages de saturations, est totale à 50 %. L'étape du relargage permet une augmentation de l'activité spécifique qui passe de 0,09 à 0,20 Up/ml pour l'extrait de poulet et de 0,065 à 0,44 Up/ml pour l'extrait de limon.

En fin de purification, nous avons constaté que la pepsine de poulet est concentrée environ 20fois .En effet, l'activité spécifique passe de 0,09 dans l'extrait brut à 1,85 dans l'extrait purifié, soit un rendement d'activité de 8,06%. Ce qui correspond à une perte de 92,94% de l'activité initiale. La pepsine de limon, quand à elle, est concentrée 25fois. Et présente un rendement d'activité supérieur à celui de la pepsine de poulet (13,10%), ce qui traduit à une perte de 86,9% de l'activité initiale.

En définitif, nous pouvons dire que la purification nous a permis d'éliminer une partie importante des protéines inactives et indésirables contenues dans les extraits bruts. En effet, 0,39% des protéines totales ont été récupérées pour la pepsine de poulet et 0,53% pour la pepsine de limon.

Après purification, les paramètres optimums d'activité des deux extraits ont été déterminés. L'examen des résultats comparés permet de faire les observations suivantes :

-L'origine des protéases influe sur la stabilité des extraits purifiés. En effet, les résultats obtenus montrent que la température optimale d'activité de l'extrait avicole est voisine de 40°C, celle de limon est de 45°C. Les concentrations habituellement utilisées en technologie fromagère se situent dans l'intervalle de 0,01à0,02M de CaCl₂ du lait, pour cela, la pepsine de poulet peut être aisément utilisée dans ces conditions puisque son activité est optimale à 0,02M. Néanmoins, il est établi que l'origine de l'enzyme n'est pas le seul paramètre expliquant cette différence. On évoquera pour cela : le degré de pureté, les méthodes d'extraction, ...etc.

-La conservation des préparations coagulantes est généralement meilleure à des températures très basses (congélation).

-En ce qui concerne l'activité protéolytique, l'enzyme de poulet a une activité légèrement plus élevée que celle de limon mais toutes les deux manifestent une protéolyse plus marquée par rapport à la présure traditionnelle.

Compares aux substituts d'origine microbienne et végétale, l'extraction et la purification des protéases a partir des viscères représentent sans doute des techniques plus onéreuse eu égard à la structure des tissus qui les composent et la difficulté de manipulation de sous produits très polluants. Cependant, leur pouvoir protéolytique, leur action spécifique sur les caséines du lait et la similitude de structure avec la Chymosine sont autant de facteurs qui les prédisposent comme la présure traditionnelle à une utilisation très favorable en fromagerie. A cet effet, il reste à déterminer l'intérêt de promouvoir les méthodes d'extraction et de purification pour constituer, sans doute, une meilleure approche pour une production industrielle de ces substances. Les tentatives de valorisation des protéases extraites d'organismes animaux s'inscrivent bien dans une telle perspective.

CHAPITRE V : APPLICATION FROMAGERE

Première expérience :

Profil sensoriel et aptitude fromagere des extrais coagulants purifiés de l'artichaut dans la fabrication d'un fromage à pâte molle.

INTRODUCTION :

C'est dans un contexte lié aux modifications des habitudes alimentaires que les chercheurs s'intéressent de plus en plus à l'étude des extraits coagulants végétaux dont les principaux avantages sont la disponibilité du matériel végétal, la forte stabilité de leurs coagulases à la chaleur, et le potentiel d'utilisation technologique relativement simple (**VERISSIMO et al. 1998**). De très nombreuses préparations coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures (graines, feuilles, fleurs, fruits) (**RAMET, 1997**). Parmi les espèces de climats tempérés, on trouve les feuilles et tiges du gaillet, les fleurs du chardon et de l'artichaut (**RAMET, 1997**). L'une des préparations coagulantes les plus utilisées avec succès dans la fabrication de certains fromages traditionnels au Portugal et en Espagne est obtenue à partir de fleurs de Cardon (*Cynara cardunculus*) (**CORDEIRO et al., 1992**). Dans les régions chaudes, on exploite également à cette fin plusieurs plantes dont on extrait des principes coagulants : les ficines issues du latex du figuier, la papaïne issue du papayer et la bromélaïne de l'ananas (**RAMET, 1997**). La liste des plantes étudiées ne s'arrête pas là. Cependant, les travaux n'ont pas donné lieu à des préparations enzymatiques d'un intérêt certain pour la fromagerie. En effet, les avis sont partagés quant à leur utilisation. Pour les uns leur emploi ne pose pas de problèmes, tandis que d'autres leur reprochent des inconvénients inhérents qui limitent leur utilisation. Les protéases issues des plantes sont considérées trop protéolytiques, menant à la formation d'acides excessifs, goûts amers suivis de défauts de texture du fromage (**SIDRACH et al., 2005**). L'aptitude fromagère a pu être améliorée après purification des extraits notamment dans le cas de la ficine (**RAMET, 1997**). Cependant, et depuis la dernière décennie, la demande des fromages dits végétaux est en augmentation constante dont les pays de la péninsule ibérique demeurent les plus grands producteurs des fromages d'appellation d'origine (**Roseiro et al., 2003**).

L'objectif de ce présent travail vise à étudier la possibilité d'utiliser l'agent coagulant de fleurs d'artichaut cultivé à travers l'analyse sensoriel d'un fromage à pâte molle.

METHODOLOGIE

.La méthodologie appliquée dans la préparation des extraits enzymatiques , la dépigmentation et la purification est décrite dans le **Chapitre III**.

La fabrication du fromage a pate molle type camembert a été réalisée a l'unité *Lavalait* (El Kseur, Bejaia) selon le diagramme technologique adopte par cette unité. Les essais sont menés a l'échelle pilote sur un volume d'environ 50 litres de lait de vache. Les fromages expérimentaux sont compares aux échantillons témoins préparés dans les mêmes conditions a partir d'agent coagulant clone d'*Aspergillus niger var. Awamori*.

Les extraits enzymatiques ont été concentre a travers une membrane d'ultrafiltration au seuil de coupure de 30 kDa a l'aide d'un systeme d'ultrafiltration Minimate™ TFF Capsule.

Méthodologie de la dégustation

Une fiche de dégustation (**Annexe11**) élaborée suivant l'adaptation à l'objectif de l'essai est utilisée dans le présent test. Elle comporte les critères de qualité les plus élémentaires de la dégustation mais considérés comme les principales caractéristiques impliquées dans le terme de « qualité » (**CHEFTEL et al. , 1977**) à savoir l'appréciation par le dégustateur, de la couleur, du goût et de la texture de la pâte des fromages. Chaque critère code comporte une échelle de notation (score) commune de 1à10 (1= très mauvais, 10= excellent, 5= limite d'acceptabilité). Le test est mené par 10 panélistes. (**Annexe12**) représentés par un maitre fromager et des ouvriers spécialisés en fromagerie.

La différence statistique entre les lots est évaluée à l'aide du **Quick Rank Test** de **KRAMER (1960)** basé sur la somme des rangs. Le seuil de probabilité est de 5% (p :0.05).

RESULTATS ET DISCUSSION

1- Physicochimie du fromage

Analyses	E.S.T (%)	E.S.D. (%)	M.G. (%)	Chlorures (%)	Teneur en eau (%)	Gras sur sec (%)
Fromage P(1) témoin présure.	68,3	47,3	21	2,8	31,7	30,8
Fromage EEB (2) à base d'extrait enzymatique brut.	72,5	52,5	20	2,5	24,5	27,6
Fromage EEP (3) à base d'extrait enzymatique purifié.	74,5	53,5	21	2,3	25,5	28,2

Le tableau suivant résume les résultats physicochimiques des différents fromages

Le taux de l'extrait sec varie d'un type de fromage à un autre, dans de larges limites, et dépend d'une part de la composition initiale du lait et d'autre part de la manière dont sont effectués la coagulation et l'égouttage. Ces paramètres déterminent le taux de l'extrait sec du fromage (Alais, 1984). Les teneurs de l'extrait sec des deux fromages présentent des valeurs légèrement supérieures à celles du fromage témoin .

D'après Nunez et al. (1991), le caillé à base d'extrait de fleurs d'artichauts sauvages donne lors du découpage des graines de caillé de taille réduite en comparaison avec un caillé présuré, ce qui explique l'égouttage particulièrement rapide qui serait la cause de son extrait sec élevé. En revanche, le rapport Gras/Sec des fromages expérimentaux sont inférieurs à celui du fromage témoin, soit 2 – 3% d'écart. Le taux de matière grasse du fromage dépend de la composition du lait mis en œuvre, ainsi que la manière de coaguler le lait et de travailler le caillé. Le rapport gras/sec permet d'apprécier d'une façon notable la matière grasse contenue dans l'extrait sec (Veisseyer, 1975).

La teneur en matière grasse du fromage a base d'extrait enzymatique brut présente une valeur légèrement inférieure à celle du fromage témoin et le fromage préparé avec l'extrait purifié.. La teneur en chlorures des fromages est supérieure à la teneur minimale recommandée soit 1,5 à 2%. Cette différence de teneur en chlorure de sodium est due à la concentration élevée de chlorure de sodium dans la saumure utilisée lors du procédé de fabrication.

2- Analyse sensorielle

Les résultats de l'analyse sensorielle portant sur les critères : couleur, texture et goût des Camemberts préparés avec la Chymosine d'*Aspergillus niger* et les extraits brut et purifié des fleurs de *Cynara scolymus* sont représentés par les histogrammes de la **Figure V 1**.

La différence entre les différents lots de fromage est jugée non significative dans l'intervalle de rang total compris entre 14 et 26, au seuil de probabilité de 5%.

Couleur

Selon la somme des rangs (SR), le fromage (3) se situe dans l'intervalle de signification [14-26]. Le fromage (1) est statistiquement meilleur que les lots fabriqués à base d'extraits végétaux. Le fromage (2) est statistiquement le plus faible. Sa couleur prononcée est due à la présence de mélanoïdines formés lors de la polymérisation des substrats phénoliques colorés sous l'action des enzymes du brunissement (PPO).

Selon la moyenne des scores (MS), la couleur du fromage (1) semble la mieux appréciée par les panélistes, tandis que le fromage (2) présente la note la plus faible. Toutefois, les scores de l'ensemble des lots attribués par les panélistes sont supérieurs à la limite acceptable.

Goût et texture

Sur le plan goût et texture et selon la somme des rangs (SR), aucune différence significative n'est observée entre les échantillons de fromages au seuil de probabilité de 5%. Cependant, les fromages peuvent être classés par ordre d'appréciation suivant: les fromages à base d'extraits coagulants végétaux sont mieux appréciés que le fromage témoin à base de présure microbienne.

Observations

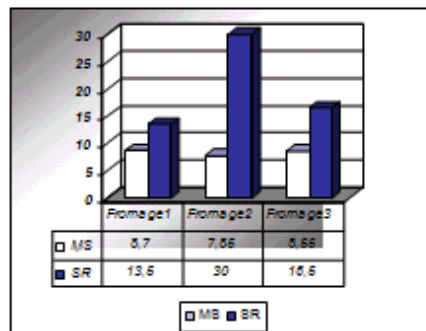
Un arrière-gout amer, non désagréable, plus marqué est observé au niveau du fromage (2) résultant vraisemblablement d'une protéolyse excessive au cours de l'affinage provoquée par l'extrait brut. Néanmoins, l'arrière-gout amer des fromages n'est pas perçu de la même manière par tous les panélistes.

Il est à remarquer aussi que les fromages (2) et (3) présentent une texture plus molle que le fromage témoin (fromage (1)). Ce phénomène est attribué à un développement plus rapide de la texture de la pâte des fromages à base de présure végétale pendant l'affinage, dû à une activité protéolytique élevée.

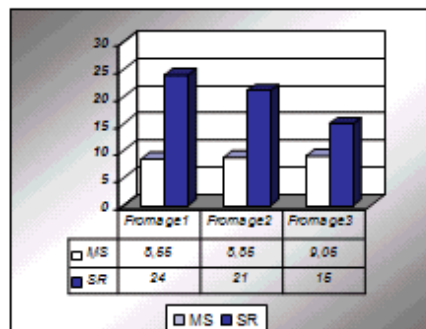
Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par d'autres auteurs (**Viera de Sà et Barbosa, 1972 ; Barbosa et al. , 1976 ; Samson, 2002**) lesquels ont indiqué un goût amer et une texture molle des fromages fabriqués avec les extraits coagulants de *Cynara crdunculus*.

Ainsi, les paramètres couleur, texture et goût répondent aux normes requises pour les fromages type « Camembert ». Par ailleurs, on remarque que l'ensemble des lots présentent une qualité sensorielle comparable et appréciée par le jury dégustation.

Couleur



Texture



Goût

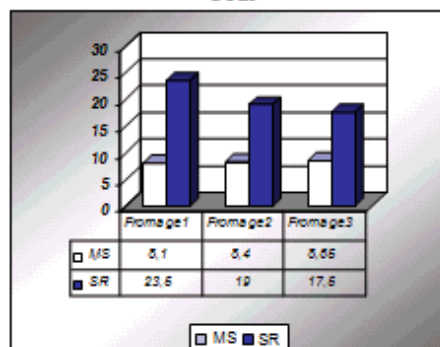
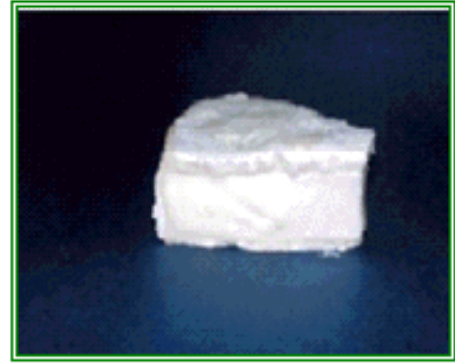


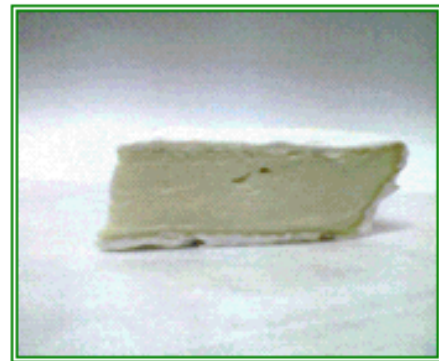
Figure V.1 : Histogrammes d'analyse statistique des paramètres sensoriels (couleur, texture, goût) des fromages.

Fromage 1 : Fromage presure témoin, **Fromage 2 :** Fromage a base d'EEB, **Fromage 3 :** Fromage a base d'extrait purifié

ILLUSTRATIONS



Texture de la pâte du fromage témoin



Texture de la pâte du fromage à base d'extrait coagulant brut.

*Figure V.2 : Aspect des fromages témoins et des fromages a base d'extraits coagulants de *Mucor pusillus**

Deuxième expérience :

Aptitudes à la coagulation des laits de chèvre et de brebis par des extraits coagulants de poulet et de poisson

INTRODUCTION

Les enzymes d'origine animale sont, pour la plupart, obtenues à partir de sous produits d'abattage, disponible et peu couteuse a l'exception de la Chymosine qui nécessite l'abattage de jeunes bovidés avant sevrage dont l'inconvénient du sacrifice a constitue aujourd'hui la base de recherche sur les enzymes de remplacement. Malgré des caractéristiques très proches de la Chymosine, l'emploi des pepsines animales en fromagerie particulièrement celles d'origine marines ou de volatils n'a pu aboutir à une application industrielle (**GREEN (1972)**, **GORDIN et ROSENTHAL (1978)**, **FINDLAY et al. (1984)** ; **PAEZ DE LEON et al. (1995)**). Parallèlement aux travaux sur les succédanés de la présure, de nombreuses études ont été réalisées sur l'aptitude des laits à la coagulation par la présure. Cependant, rare sont celles qui ont concerné l'aptitude des laits des petits ruminant bien que certaines régions du sud de l'Europe ont manifestement développé plusieurs fromages a base de lait de chèvre et de brebis (**NUNEZ et al, 1989** ; **ELGADO, 1993** ; **COGAN et REA, 1996**). Beaucoup de ces fromages ont reçu le label de Produits d'Appellation d'Origine (PAO). Cependant faut il le rappeler que les agents coagulants utilises sont dans la majorité des cas proviennent des extraits enzymatiques d'origine ovine, caprine ou végétale.

Dans cette optique, notre travail pourrait contribuer a la valorisation des laits de petits ruminants en examinant les possibilités de substituer des extraits enzymatiques obtenus à partir du proventricule de poulet et de l'estomac du poisson (limon) à la présure traditionnelle dans la coagulation des laits de chèvre et de brebis.

METHODOLOGIE

1- Etude des laits et des fromages:

Les laits crus de petits ruminants (la race « Arabia » pour les caprins et la race « Hamra » pour les ovins) ont été recueillis au niveau de la station expérimentale de l'ITELV. L'alimentation du cheptel se composait d'un mélange de foin d'orge et d'avoine (1 kg 500) en plus de l'orge en grain (300 gr).

Pour les essais de fabrications de fromage, nous avons suivi les différentes étapes du diagramme développé par **LUQUET (1985)**, dont les étapes sont résumées dans **la figure V.5**.

La température choisie lors de nos essais est de 30°C à 35°C pour le lait de chèvre et 35 à 40°C pour le lait de brebis, ces températures permettent selon **ALAIS (1984)**, l'accélération du développement de la microflore du lait.

1-1- Composition physico chimique du lait et du fromage

Le dosage des différents constituants du lait et du fromage a été réalise par les méthodes développées dans la norme **AFNOR (1986)**.

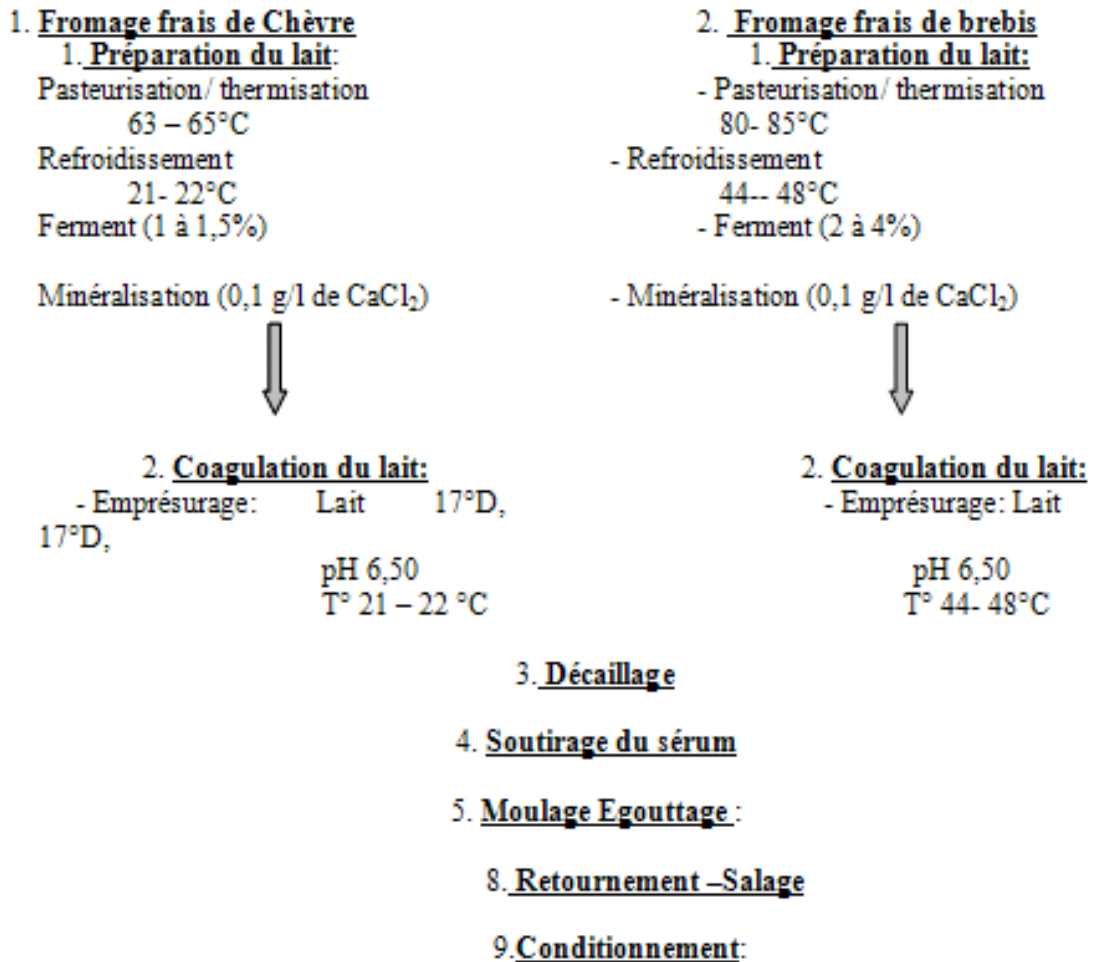


Figure V.3: Diagramme de fabrication du fromage frais (LUQUET, 1985)

2- Rendement fromager :

La matière sèche d'un litre de lait est répartie pour la moitié dans le fromage, l'autre moitié se trouve dans le lactosérum. Cette répartition des composants se trouve sensiblement constante pour un fromage donné, elle se définit en pratique fromagère par la notion de **rendement fromager**. Le rendement fromager ou le rendement de la transformation est l'expression mathématique de la quantité de fromage obtenu à partir d'une quantité donnée de lait (100 l ou 100Kg). Cette notion présente un grand intérêt en industrie fromagère car elle reflète globalement comment a été réalisé la répartition lors de l'égouttage ; elle permet donc de juger pour un type de fromage donné si la fabrication a été menée dans de bonnes conditions.

Le principe est basé sur la mesure de l'extrait sec dégraissé (ESD) retrouvé dans le fromage. Selon **ECK (1990)**, le rendement fromager s'exprime par la formule suivante :

$$\text{Coefficient} = \frac{10 \times \text{ESD} \times \text{P.}}{\text{V}}$$

Avec :

P : poids de fromage obtenu en Kg.

V : quantité de lait mise en œuvre en l

ESD : extrait sec dégraissé du fromage (ESD= EST-MG)

3- Tests organoleptiques :

le fromage est présenté à un jury de dégustation composé principalement du personnel de la fromagerie de la Laiterie fromagerie de Boudouaou (LFB).

Le dégustateur doit se référer aux caractéristiques du fromage en question pour évaluer le produit en remplissant un questionnaire (**annexe**).

Analyse statistiques:

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GENSTAT. Ed. 9, l'évolution des différents paramètres ont été appréciées par l'analyse de la variance.

RESULTATS ET DISCUSSION

1- Etude des laits et des fromages de chèvre et de brebis

1-1- Analyses physicochimiques des laits et des fromages

1-1-1- Les laits

Le **tableau V. 1** récapitulatif de la composition des laits utilisés indique un profil physicochimique qui se rapproche de celle des petits ruminants décrite par la littérature (PARK AET AL,(2007). Les laits de brebis sont caractérisés par des teneurs élevées en extrait sec (protéines, Matières grasses) qui d'ailleurs les prédisposent a une coagulation efficace par les enzymes végétales (**SOUSA ET MALCATA, 1997**.) Ces deux paramètres constituent les facteurs majeurs contrôlant le rendement du fromage . L'analyse de la variance confirme une différence significative entre les laits pour l'ensemble des constituants au seuil de probabilité de 5%.

Analyses	Type de lait	Résultats	Normes (FAO,1995)
pH	Chèvre	6,60±0.02	6,45-6,60
	Brebis	6,81±0.031	6,50-6,85
Acidité	Chèvre	16,33±0.542	14-18°D
	Brebis	21,83±0.626	22-25°D
Densité	Chèvre	1030,54±0.260	1027-1035
	Brebis	1038,14±0.3	1034-1039
Matière grasse	Chèvre	33,88±0.441	43 g/l
	Brebis	37,56±0.510	75 g/l
Extrait Sec Total	Chèvre	121,17±0.763	136-140 g/l
	Brebis	148,82±0.881	193 g/l
Protéine totale	Chèvre	33,03±0.250	28-35 g/l
	Brebis	56,81±0.289	55,15 g/l
Calcium	Chèvre	1,34±0.085	1,35 mg/l
	Brebis	1,92±0.098	2 mg/l
Phosphore	Chèvre	0,91±0.014	0,92 mg/l
	Brebis	1,21±0.016	1,18 mg/l

Tableau V.1 : Résultats des analyses physico-chimiques des laits de chèvre et de brebis

1.1.2- Les fromages

A ce niveau et afin d'apprécier le profil sensoriel des fromages, on s'est intéressé aux résultats observés chez les taux de protéines, de matières grasses, de l'extrait sec et du rendement fromager.

Extrait sec total

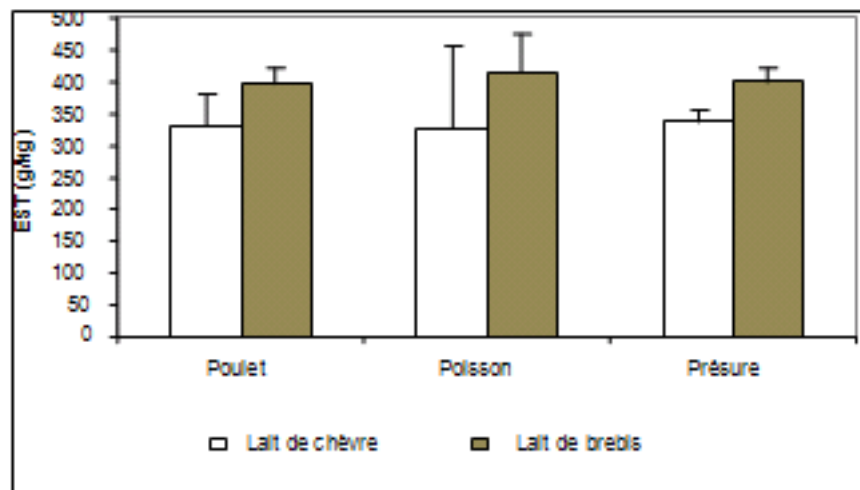


Figure V.4 : EST moyen des différents fromages

D'après les résultats, le taux d'humidité de tous les fromages frais obtenus à partir du lait de chèvre est supérieur à celui des fromages obtenus à partir du lait de brebis. En effet, la moyenne des pourcentages d'humidité des fromages est de 66,83% et 59,6% pour le lait de chèvre et de brebis respectivement. Les valeurs moyennes des EST des fromages frais

obtenus à partir du lait de chèvre sont de: $331 \pm 33,2$ g/kg ; $337 \pm 33,2$ g/kg et $327 \pm 33,2$ g/kg pour les extraits enzymatiques du poulet; de la présure et du poisson respectivement. En ce qui concerne les fromages frais obtenus à partir du lait de brebis, ces valeurs sont de: $395 \pm 38,4$ g/kg; $401 \pm 38,4$ g/kg et $416 \pm 38,4$ g/kg.

Nos résultats se rapprochent de ceux cités par **SOUSA et MALCATA (1997)** qui rapportent une teneur de 350 g/kg pour le fromage de brebis. Ces derniers soulignent que s'il ya une différence dans la valeur de l'EST entre différents essais d'un même type de fromage, celle-ci est due à la composition initiale des types de laits.

RENNER (1987) rapporte un pourcentage de 21% d' l'extrait sec total pour le fromage frais, alors que **JELLEN ET RENZ-SHAVEN (1989)** rapportent une valeur de 18% pour le Quarg. L'analyse de la variance nous indique qu'il y a une différence significative selon le type de lait ; cependant la source d'enzyme ne semble pas influencer sur la teneur en extrait sec.

Matière grasse:

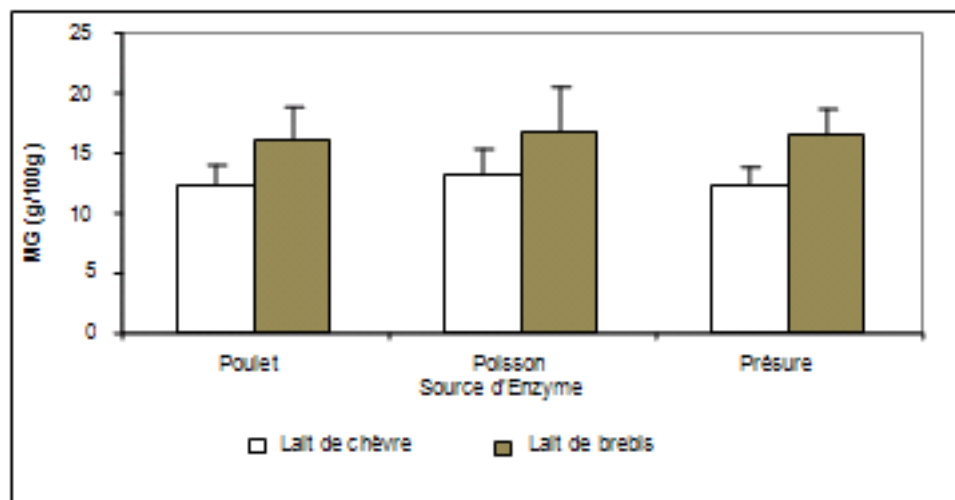


Figure V.5: Valeur moyenne de la MG des différents fromages

Les valeurs des teneurs en matière grasse des fromages obtenus à partir du lait de chèvre sont de: $12,32 \pm 1,165$ g/100g; $12,27 \pm 1,165$ g/100g et $13,12 \pm 1,165$ g/100g pour les extraits enzymatiques du poulet, de la présure et du poisson respectivement. Dans le même ordre, ceux des fromages obtenus à partir du lait de brebis sont de : $16,20 \pm 1,345$ g/100g; $16,53 \pm 1,345$ g/100g et de $16,83 \pm 1,345$ g/100g. L'analyse de la variance nous indique qu'il y a une différence significative selon le type de lait ; cependant la source d'enzyme ne semble pas influencer sur la teneur en matière grasse. Le rapport Matière Grasse/ Extrait sec total, caractéristique importante des fromages, permet d'apprécier d'une façon précise la teneur en MG dans 100g d'extrait sec total (**VEISSEYER, 1975**).

Le tableau suivant résume les différentes valeurs du rapport MG/EST

	Fromage de chèvre	Fromage de brebis
Poulet	37,2	46,28
Présure	36,4	41,22
Poisson	40,12	40,45

Nous pouvons remarquer que ce rapport est beaucoup plus élevé chez les fromages du lait de brebis par rapport à celui des fromages du lait de chèvre. Ceci traduit par la richesse

en MG du lait de départ. Cependant ces résultats restent faibles par rapport à la valeur rapportée par **SOUSA et MALCATA. (1997)** pour les fromages frais de brebis qui est de 68 %.

Protéines:

Les valeurs des protéines obtenues lors de nos différents essais révèlent les teneurs suivantes : Pour les fromages faits à partir du lait de chèvre: $12,40 \pm 0,797$ g/100g; $13,08 \pm 0,797$ g/100g et de $11,84 \pm 0,797$ g/100g soit 37,4%, 34,6% et 36,2%.

Pour les fromages obtenus à partir du lait de brebis : $13,60 \pm 0,920$ g/100g et $13,81 \pm 0,920$ g/100g et de $12,70 \pm 0,920$ g/100g soit: 34,4%, 34,4% et 30,5% pour les extraits enzymatiques du poulet, de la présure et du poisson respectivement.

SOUSA ET MALCATA (1997), dans une étude sur les fromages faits à partir de laits de brebis et de chèvre, rapportent des teneurs en protéines (% de MS) pour ces fromages à l'état frais de: 38% pour le fromage Serra fait à partir du lait de brebis; 43% pour le fromage Serra fait à partir du lait de chèvre. 45% pour le fromage Serra fait à partir du lait de brebis (**NUNEZ et al., 1991**). 13,8 % pour le djeben marocain. (**HAMMAMA et BAYI, 1991**) et 10 à 18 % pour les fromages frais (**RENNER, 1987**)

Nos résultats sont assez proches l'un de l'autre, cependant ils diffèrent avec certaines valeurs rapportées par la littérature, ceci soit est dû à la composition initiale du lait ou alors aux différentes étapes que subi le lait lors de la transformation. Une perte de protéines au niveau du lactosérum a cependant été notée. La **figure V**. illustre les résultats obtenus.

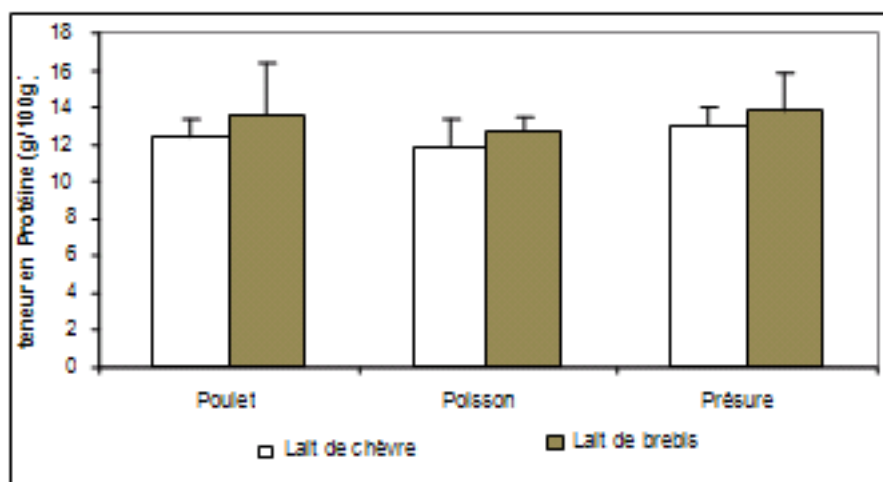


Figure V. 6 : Valeurs moyennes du taux protéique des différents fromages

L'analyse de la variance montre qu'il n'y pas de différence significative ni en fonction du type de lait, ni par rapport à la source d'enzyme. Ces deux variables ne semblent pas affecter la teneur en protéines.

2- Rendement fromager

Le rendement fromager présente un grand intérêt en industrie fromagère car il reflète globalement comment a été réalisé la répartition quantitative des constituants du lait lors de l'égouttage. Sur une moyenne de de 4 à 5 boules de fromage frais représentant 05 litres de lait frais par échantillon, les rendements en fromage obtenus sont représentés par la **figure V.8** L'ordre des valeurs des rendements fromagers obtenus lors de la réalisation des essais,

est comme suit: fromage brebis-présure> fromage brebis-poulet> fromage brebis-Poisson> fromage chèvre-présure> fromage chèvre-poulet> fromage chèvre -Poisson.

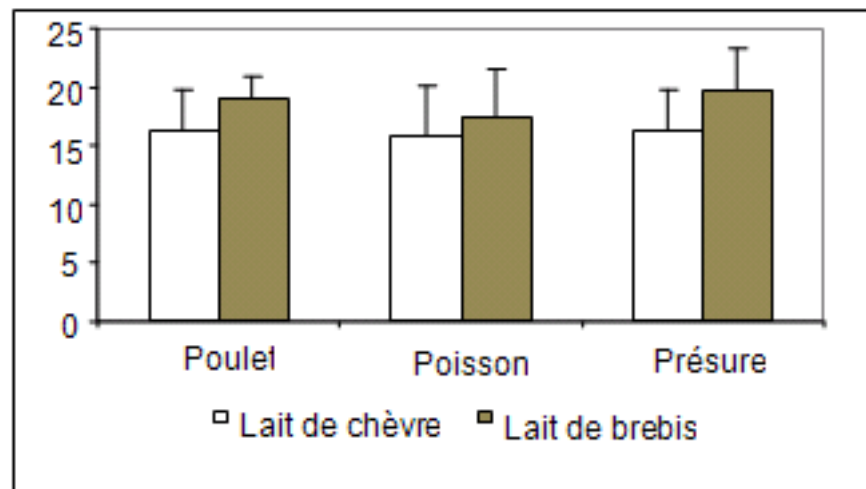


Figure V. 7: Valeurs moyennes des rendements en fromages obtenus d a partir des laits de chèvre et de brebis

Un bon rendement nécessite un taux élevé en extrait sec et plus précisément en protéines (caséine) et des concentrations élevées en matière grasse (MACEDO et al., 1993) ; cas du lait de brebis qui présente des concentrations en EST et en protéines plus élevées que celles du lait chèvre . Cependant, malgré que le rendement potentiel du fromage obtenu à partir du lait soit clairement relié aux concentrations en caséines et en matière grasse, les rendements dépendent aussi de l'efficacité avec laquelle ces composants du lait sont incorporés dans le caillé et du taux de solides retenus dans le sérum (STORRY et al., 1983). COULON et al. (1998) rapportent qu'il est important de connaître l'amplitude et les facteurs de variation de la proportion des caséines dans les protéines totales du lait, d'autant que certains fromagers disent observer un rendement de transformation moins que proportionnel a la teneur en protéines quand celle-ci augmente. NUNEZ et al. (1991), affirme que le rendement fromager du lait de brebis dépasse d'une manière significative celui du lait de chèvre.

Les résultats des rendements obtenus sont résumés comme suit :

Pour les fromages frais de chèvre: $16,17 \pm 1,778$; $16,38 \pm 1,778$ et de $15,88 \pm 1,778$

Pour les fromages frais de brebis: $18,97 \pm 2,054$; $19,79 \pm 2,054$ et de $17,34 \pm 2,054$ pour les extraits enzymatiques du poulet, de la présure et du poisson respectivement.

L'analyse de la variance des rendements nous indique qu'il n'y a pas de différence significative en fonction de la source d'enzyme, ni en fonction du type de lait.

3 -Analyses sensorielles:

Les fromages des laits de brebis et de chèvre ont été présentés de façon anonyme à un jury de dégustation, interrogé sur les caractères de la pâte : l'aspect, la texture, la couleur et le goût des six (06) types de fromages :

Les trois (03) fromages obtenus à partir du lait de Chèvre présentent une surface fissurée, hétérogène à caractère friable. La couleur blanchâtre de ce fromage est due à l'absence de la β carotène responsable de la couleur jaunâtre chez le lait de vache.

- Fromage a base d'extrait de poulet :

80% des membres du jury de dégustation ont jugé ce fromage amer, 50% d'entre eux l'ont trouvé friable, r che et salé avec un goût de chèvre prononcé et 40% l'ont qualifié de très dur et d'acide.

- Fromage a base d'extrait de poisson :

80% des dégustateurs ont jugé le fromage amer. 70% l'ont trouvé moyennement salé. 50% des membres du jury lui ont attribué les caractères suivants : pâte dure, texture friable, moyennement acide, très granuleux et donc r che et un goût prononcé de l'animal.

- Fromage coagulé avec la présure:

Ce fromage se caractérise par une croûte légèrement lisse (80% du jury). 60 % des membres du jury lui ont attribué les caractères suivants : acidité élevée, granuleux, texture friable. 50% d'entre eux, l'ont trouvé amer avec une présence d'un goût caractéristique de l'animal. 40% l'ont trouvé moyennement salé, r che et dur.

Les trois fromages de brebis ont été évalués par le jury comme suit :

- Fromage a base d'extrait de poulet:

70% des membres du jury ont trouvé que ce type de fromage avait un léger goût d'amertume, d'acidité et moyennement salé. 60% d'entre eux ont jugé que sa surface était plus ou moins ridée et plus ou moins bien structur e avec un léger goût de laitage et une odeur intense. 50% l'ont qualifié ayant une texture moyennement ferme, r che avec la présence d'un goût de gras.

- Fromage a base d'ex:trait de poisson

70% des membres du jury ont trouvé que le fromage avait un léger goût d'amertume et d'acidité avec une légère saveur de laitage frais. 60% ont trouvé que le fromage était légèrement dur et moyennement friable. 50% d'entre eux l'ont qualifié de moyennement gras donc glissant et moyennement salé. Ce fromage présente une surface moins lisse que son pr c dent et une texture plus ou moins ferme et uniforme.

- Fromage a base de presure:

70% des membres du jury lui ont attribué une texture ferme et un léger goût de laitage frais. 60% ont ressenti un très léger goût d'amertume, d'acidité et une concentration moyenne en NaCl et de gras rendant le fromage plus ou moins glissant. Dans la même proportion, le jury a jugé la pâte moyennement friable et granuleuse.

Discussion

En général, les fromages de brebis se caractérisent par : une surface plus ou moins lisse, uniforme et bien structur e, et sont de couleur jaune pâle. Le fromage présente un arôme de laitage frais et une texture plus ferme. Selon **BARBOSA (1985)**, le fromage de brebis, à l'état frais non affiné, doit être homogène avec des surfaces lisses et exemptes de trous à l'intérieur. C'est ce que nous avons constaté dans nos essais.

Les fromages de chèvre présentent une surface plus ou moins ridée, une pâte hétérogène à caractère friable. Il a été remarqué lors de certains essais, que l'acidité un peu élevée à l'emprésurage induisait une grande friabilité de la pâte alors que lorsqu'on

emprésure à pH modèle, la pâte apparaît moins friable. D'après **SILVA et al. (2002)**, le caractère de friabilité des fromages de chèvre est lié au rapport gras/sec et à la teneur en caséine α S1. La texture du réseau protéique diffère en fonction de la proportion de caséine α S1 dans le caillé. Il est bien établi que le ramollissement de la pâte est dû en premier lieu à la dégradation de la caséine α S1 par la présure qui libère en particulier le peptide 1-23, or la caséine α S1 caprine se différencie de celle ovine par la présence d'un résidu valine en position 24 de la chaîne peptidique et de ce fait l'aptitude à l'hydrolyse de cette protéine par la chymosine pourrait être modifiée. Selon **RAMEUF et al. (1989)** un gel ferme provient en général d'un lait riche en protéine ce qui explique la différence de fermeté entre le fromage de brebis et celui de chèvre.

- L'acidité moins prononcée pour les fromages de brebis de même que la légère sensation d'amertume notée n'a pas dérangé les dégustateurs.
- L'aspect lisse et uniforme de la surface du fromage est plus présent dans les fromages de brebis que dans les fromages de chèvre.
- Les fromages de chèvre sont plus blancs que ceux du lait de brebis.
- Le fromage de brebis a une texture ferme d'après le jury alors que celle des fromages de chèvre a été considérée comme étant légèrement ferme. D'après **MACEDO et al. (1993)** la texture comme la saveur et l'arôme du fromage sont directement dépendants de leur composition (Humidité, protéines, matière grasse, et éléments minéraux).
- L'amertume des produits laitiers est due à la présence de peptides amers. Une fois isolés, ces derniers ne peuvent être identifiés comme étant amers ou non qu'après identification de leurs acides aminés terminaux. Les peptides hydrophobes sont moins présents dans les fromages de lait de brebis que dans le lait de chèvre (**CARRERA et al., 1995**).

CONCLUSION

La composition des laits utilisés lors de nos essais, vis-à-vis particulièrement des protéines et la matière grasse, n'est pas différente de celle rapportée par la bibliographie qui révèle que les constituants des laits de brebis sont plus abondants par rapport aux laits de chèvre. Statistiquement, cette composition chimique des laits varie significativement en fonction du type de lait, et par voie de conséquence les fromages.

Le lait influe sur la qualité sensorielle des fromages, les fromages fabriqués à partir du lait de brebis présentent des caractéristiques agréables comparées à celle des fromages à base de lait de chèvre et ce, sans prendre en considération la source du coagulant. Les résultats statistiques ont révélé que le rendement fromager ne varie ni en fonction du type de lait ni en fonction de la source d'enzyme utilisée. En effet, dans le cas des fromages frais, le diagramme de fabrication adopté ne permet pas une appréciation sensorielle valable lorsque l'aspect affinage est absent, siège de nombreuses modifications biochimiques. Toutefois, les propriétés organoleptiques des produits élaborés, les rendements fromages enregistrés sont autant de facteurs qui contribuent à reconnaître aux pepsines animales les aptitudes appréciables à coaguler le lait.

Dans un autre volet de l'étude et à travers les profils sensoriels, les fromages fabriqués avec les extraits enzymatiques de l'artichaut (brut et purifié) ne présentent pas de différences

notables par comparaison au fromage témoin fabriqué avec la chymosine d' *Aspergillus niger* dans les condition pilotes de préparation. A travers les résultats observés sur les extraits de fleurs d'artichaut, on estime que des similitudes avec les extraits du cardon (*Cynara cardunculus*) ont été confirmées.

CONCLUSION GENERALE

L'étude menée sur la recherche des succédanés de la présure traditionnelle nous a permis à travers les résultats enregistrés de situer les "avantages et les inconvénients" des caractéristiques biochimiques des extraits coagulants obtenus. Le choix des sources potentielles productrices de protéases demeure aléatoire au vu des nombreux produits et matières premières d'origine diverse qui ont constitué le substrat d'extraction des enzymes protéolytiques de notre projet.

Ainsi, une protéase d'origine fongique obtenue à partir d'une culture en surface de la souche de *Mucor pusillus* référencié, les extraits coagulants de la sève de figuier (*Ficus carica*) et des fleurs d'artichaut (*Cynara scolymus*), les protéases extraites du proventricule de poulet (*Gallus gallus*) et de l'estomac de poisson (*Seriola sp.*) représentent les substrats de notre travail :

L'objectif de l'étude de la protéase issue de la culture de la souche de *Mucor pusillus* est une contribution à une meilleure connaissance de cette enzyme coagulant le lait. Les résultats montrent que l'extrait enzymatique brut, obtenu à partir de la culture en surface de *Mucor pusillus*, est caractérisé par une force coagulante de 1 /1200 .

Plusieurs protocoles de purification ont été appliqués. Il a été conclu que l'étape du fractionnement au sulfate d'ammonium (40 - 80 % de saturation) de l'extrait enzymatique brut de la souche fongique étudiée n'est pas préconisée. En effet, une chute importante de l'activité coagulante a été constatée (28,53 %) avec un facteur de purification voisin de 3. De plus, l'étude électrophorétique sur SDS- PAGE ne montre aucune différence entre l'extrait précipité par fractionnement et celui précipité directement à 80 % de saturation. Par ailleurs, la chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100 de l'extrait enzymatique brut lyophilisé a permis d'obtenir un meilleur rendement de l'ordre de 55,13 tout en multipliant par un facteur de 20,88 l'activité spécifique de la coagulase.

La purification par électrophorèse sur SDS-PAGE de la fraction coagulante purifiée relève une seule bande homogène de poids moléculaire de l'ordre de 49 000 Daltons. PM juge assez élevé pour le genre *Mucor* et confirme par une analyse protéomique qui a enregistré une masse moléculaire de 46 kDa pour une séquence en acides aminés de la protéine de 427 Acides aminés.

En outre, les conditions optimales d'activité de l'enzyme purifiée sont déterminées. L'activité coagulante est maximale à un pH de 5, à une température de 50°C et à une concentration en CaCl₂ du lait de 0,02 M. Les résultats montrent par ailleurs, que l'enzyme est caractérisée par une activité coagulante relativement stable dans un intervalle de 30°C à 50°C pendant 30 mn. En revanche, l'entreposage à une température de - 18°C pendant 56 jours permet une meilleure conservation.

A ce stade de l'étude, les résultats mettent en évidence la possibilité d'obtenir une protéase coagulante à partir de *Mucor pusillus* dont les caractères classiques, exception faite pour la température, sont relativement analogues à ceux de la présure traditionnelle.

L'étude menée sur les extraits coagulants végétaux nous a permis d'évaluer les principales caractéristiques des enzymes purifiées par gel filtration en comparaison avec la

présure, leur activité coagulante, leur composition en protéine et la caractérisation de leur activité en fonction de divers paramètres . Une meilleure connaissance des propriétés des protéases extraites a été établie pour une meilleure future application en fromagerie locale. L'inconvénient majeur de la pigmentation excessive des extraits a été levé par l'emploi d'un gel de purification et l'étude de la stabilité des enzymes dans diverses conditions (pH, température , concentration en enzyme et en CaCl_2 ajouté au lait) a montré des similitudes avec la présure. Ces résultats confirment le bien fondé des travaux réalisés à travers le monde sur de nouvelles sources biologiques de protéases. La maîtrise des conditions d'utilisation technologique de ces succédanés a permis

de mettre sur le marché des laitages des produits d'appellation d'origine portant le label du terroir. Ce sont des fromages traditionnels , affinés aussi nobles que les produits à base de présure traditionnelle.

La valorisation des pro ventricules de poulet et des estomacs de limon, comme sources potentielles des protéases coagulant le lait , a permis de contribuer à une meilleure connaissance de la pepsine de poulet et celle de limon en vue d'une étude comparative .

Trois axes principaux ont été suivis lors de notre expérimentation, à savoir : l'extraction, la purification et la caractérisation des deux pepsines avicole et marine.

Les résultats obtenus après extraction des deux extraits enzymatiques bruts ont montré que l'activité coagulante est meilleure avec le tampon acétate. En effet, il en ressort que la force coagulante optimale de la pepsine de limon (1/545.44) est nettement plus importante que celle de la pepsine de poulet (1/3200).

Plusieurs étapes de purification ont été suivies après extraction des deux enzymes. La précipitation au sulfate d'ammonium à 50% de saturation a permis de montrer que le rendement en activité de la pepsine de limon (63,08%) est supérieur à celui de la pepsine de poulet (52,60%). La purification par échange d'anions ainsi que celle de l'exclusion moléculaire ont révélé que l'extrait coagulant de poulet présente deux pics bien distincts dont un seul est doué d'une activité coagulante, alors que l'extrait coagulant de limon présente trois pics distincts dont seulement un est également doué d'une activité coagulante.

La caractérisation de l'activité enzymatique coagulante sur le lait des deux pepsines en comparaison avec la présure a montré quelques différences. En effet, l'activité coagulante est maximale à un pH égal à 5,00 pour les deux pepsines, à une température de 40°C pour la pepsine de poulet et 45°C pour la pepsine de limon et à une concentration en CaCl_2 du lait de 0,02M pour la pepsine de poulet et 0,04M pour la pepsine de limon .Ces deux enzymes sont caractérisées par une activité coagulante relativement stable à un intervalle de 30 à 40°C pendant 30mn. L'entreposage à une température de -18 °C pendant 56 jours permet, pour ces deux enzymes, une meilleure conservation.

La pepsine de poulet et celle de limon présentent des activités intéressantes au plan de l'hydrolyse des caséines, notamment la caséine k, comparée avec la présure. Cette hydrolyse constitue la phase primaire du processus de coagulation du lait. Cette propriété permettrait d'envisager, sous certaines conditions, l'utilisation des deux enzymes en industrie fromagère.

Compte tenu de la valeur élevée de l'activité protéolytique, il serait souhaitable d'utiliser les pepsines de poulet et limon dans la production d'acides aminés destinés à l'alimentation du bétail ou à la consommation humaine.

Le pro ventricules de poulet ainsi que les estomacs de limon représentent une source abondante de protéases et pourraient donc intervenir, à faible coût, en remplacement de certaines protéases d'origine végétale, fongique ou animale.

En perspective, il serait intéressant d'apporter à ce présent travail d'autres recherches plus complémentaires, notamment :

- Déterminer les conditions optimales d'extraction de la pepsine avicole et marine en vue de leur utilisation à grande échelle.

- Mener une étude comparative sur le mode de conservation des extraits étudiés (à température ambiante, en réfrigéré, en congelé ou lyophilisés).

- Vérifier l'homogénéité protéique des fractions actives (poulet et limon), obtenues par chromatographie d'exclusion moléculaire et par conséquent estimer leur masse moléculaire.

- Envisager l'utilisation des enzymes purifiées de poulet et limon en technologie fromagère et

mener une étude comparative sur la qualité des produits finis .

- Etablir une étude de faisabilité technico-économique des extraits coagulants obtenus en fromagerie.

L'application fromagère révèle que La composition des laits utilisés lors de nos essais, vis-à-vis particulièrement des protéines et la matière grasse, n'est pas différente de celle rapportée par la bibliographie qui rapporte que les constituants des laits de brebis sont plus abondants par rapport aux lait de chèvre. Statistiquement, cette composition chimique des laits varie significativement en fonction du type de lait, et par voie de conséquence les fromages.

Le lait influe sur la qualité sensorielle des fromages, les fromages fabriqués à partir du lait de brebis présentent des caractéristiques agréables comparés à celle des fromages à base de lait de chèvre et ce, sans prendre en considération la source du coagulant. Les résultats statistiques ont révélé que le rendement fromager ne varie ni en fonction du type de lait ni en fonction de la source d'enzyme utilisée. En effet, dans le cas des fromages frais, le diagramme de fabrication adopte ne permet pas une appréciation sensorielle valable lorsque l'aspect affinage est absent, siège de nombreuses modifications biochimiques. Toutefois, les propriétés organoleptiques des produits élaborés, les rendements fromages enregistrés sont autant de facteurs qui contribuent à reconnaître aux pepsines animales les aptitudes appréciables à coaguler le lait.

Dans un autre volet de l'étude et à travers les profils sensoriels, les fromages fabriqués avec les extraits enzymatiques de l'artichaut (brut et purifié) ne présentent pas de différences notables par comparaison au fromage témoin fabriqué avec la chymosine d' *Aspergillus niger* dans les conditions pilotes de préparation. À travers les résultats observés sur les extraits de fleurs d'artichaut, on estime que des similitudes avec les extraits du cardon (*Cynara cardunculus*) ont été confirmées.

Enfin, l'approche scientifique des travaux est déterminante pour la suite de l'étude sur les enzymes de remplacement suivie de la motivation d'application en terme d'économie à travers la publication des premiers résultats.

Enfin, si l'intérêt scientifique sera évalué ultérieurement, il est intéressant à notre avis d'avoir notre propre approche d'appréciation :

Actuellement les substituts d'origine fongique dominent le marché mondial des agents coagulant le lait comparés aux présures de remplacement d'origine animale. Certes, le génie génétique a développé le clonage de la Chymosine de veau et constitue aujourd'hui, avec quelques rares restrictions réglementaires une autre voie d'application dont l'emploi en fromagerie est en pleine croissance. Qu'en est-il de l'intérêt d'explorer la biodiversité végétale, source bon marché de beaucoup de métabolites naturels que les scientifiques aujourd'hui en font l'éloge. A travers la deuxième partie du travail, on s'est efforcé d'explorer le mécanisme de production et de caractérisation des enzymes d'intérêt fromager à partir de déchets de produits comestibles sans valeur ajoutée mais non polluant, l'artichaut et le figuier et dont les caractères intrinsèques seront confrontés à ceux d'une présure industrielle. Les espèces étudiées n'est un exemple de bioressource qui a servi de base d'exploration des possibilités d'application en fromagerie. En effet, une pléthore d'espèces végétales productrices de protéases a fait toujours l'objet d'études à travers le monde avide de produits biologiques sans contrainte religieuses ou pathologiques. En définitif, les résultats obtenus à travers de longues études n'est qu'une suite logique de l'agriculture ancestrale qui utilisait des produits bruts dans la coagulation du lait principalement celui des petits ruminants (Fleurs de cardon, latex de figuier sauvage, macération de graines, ou morceaux de caillètes séchées). Néanmoins, le développement d'un produit de qualité mérite nécessairement des efforts d'examen scientifique et des connaissances dans le mécanisme biochimiques par lesquelles les présures de remplacement agissent sur les différentes fractions de la caséine. Les propriétés sensorielles et le rendement en fromage sont les principaux paramètres à promouvoir vis à vis de l'emploi de ces protéases.

Dans un autre volet de l'analyse de notre présente étude, les protéases extraites des systèmes digestifs d'animaux constituent certes une alternative au sacrifice des jeunes bovidés source de Chymosine, agent coagulant du lait par excellence. Néanmoins, l'engouement scientifique des années 80 dans la production des pepsines de remplacement de la présure a suscité à notre avis peu d'intérêt aujourd'hui quant à leur emploi en technologie fromagère malgré des résultats probants enregistrés dans la fabrication de certains fromages. Il y a lieu de préciser aussi que l'utilisation des succédanés de présure d'origine animale peut être limitée pour des raisons religieuses (Judaïsme et Islam), ou pathologiques. Le marché mondial du Halal ou *Kocher*, plus récemment, l'incidence de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), ou encore le syndrome de la grippe aviaire a eu pour conséquence une offre réduite des produits d'origine animale. A ce niveau d'autocritique, les extraits coagulants obtenus à partir d'abats d'ovins ou de caprins s'inscrivent bien dans les perspectives futures à promouvoir.

Enfin, il est très utile de remarquer que la présure commerciale qui a fait l'objet d'enzyme de référence est dans la majorité des cas une...Présure de remplacement, autrement dit un succédané.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABD-EL-RAHMAN A.M., MADKOR S.A., SHALABI S.I. ET METTWALL N.H., (1990). Rabbit pepsin as a rennet substitut. I- Extraction, purification, and characterization of the enzyme. *Minia. J. Agric. Res. And Dev.*, 12 (3): 1685- 1702.
- AGBOOLA S.,(2002). Cheesemaking from ultrafiltered milk using plant rennet. *The Australian Journal of Dairy Technology*, vol. 57, p.143.
- AIKAWA J., YAMASHITA T., NISHIYAMA M ET HORINOUCI S., (1990). Effects of glycosylation on the secretion and enzyme activity of *Mucor* rennin, an aspartic proteinase of *Mucor pusillus*, produced by recombinant yeast. *J. Biol. Chem.*, 265 (23) : 13955 – 13959.
- ALAIS C. ET LINDEN G., (1997). *Abrégé de biochimie alimentaire*. Ed. Masson, Paris, 248 p.
- ALAIS C., (1984). *Le lait*. Editions Sepiac, Paris, 814 p.
- ALAM SI, DUBE S, REDDY GSN, BHATTACHARYA BK, SHIVAJI S, SINGH L., (2005). Purification and characterization of extracellular protease produced by *Clostridium* sp. from Schirmacher oasis, Antarctica. *Enzyme Microb Technol* 36:824–831
- ALAM SI, DUBE S, REDDY GSN, BHATTACHARYA BK, SHIVAJI S, SINGH L., (2005). Purification and characterization of extracellular protease produced by *Clostridium* sp. from Schirmacher oasis, Antarctica. *Enzyme Microb Technol* 36:824–831
- ALEANDRI R., BUTTAZZONI L.G., SCHNEIDER J.C., CAROLI A., DAVOLI R., (1990). The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *J. Dairy Sci.*, 73, 241-255
- ANIFANTAKIS E.M. ET KANDARAKIS J.G.,(1983).Utilisation de la pepsine bovine en fabrication de fromage Feta fait à partir du lait de brebis. *Le lait*, 63 : 416 – 424.
- ANSTRUP K., (1980). Proteinases. In: *microbial enzymes and bioconversions*. Ed. Rose A.H. Academic Press, 93-108.
- ARECES L.B., BONINO M.B.I., PARRY M.A.A., FRAILE E.R., FERNANDEZ H.M. & CASCONO O. (1992). Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* , 37 , pp. 283-294 .
- ARIMA K., IWSAKI S., TAMURA G., !967. Milk clotting enzyme from microorganisms. Part I. Screening test And the identification of the potent fungus. *Agr.Biol.Chem.*, 31, 540-545.
- ARIMA K., YU J., IWASAKI S., TAMURA G., 1968. Milk clotting enzyme from microorganismsV. Purification and crystallisation of *Mucor* rennin from *Mucor pusillus* var. *Lindt. Appl. Microbiol.*, 16, 1727-1733.
- ARUNCHALAM K. & HAARD N.F. (1985) .Isolation and characterization of pepsin from polar cod (*Boreogadussaida*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 80, pp. 467- 473.

- AULDIST, M., MULLINS, C., O'BRIEN, B., O'KENNEDY, B. T., & GUINEE, T. (2002). Effect of cow breed on milk coagulation properties. *Milchwissenschaft*, 57, 140–143.
- BANGA-MBOKO H., GODEAU J.M., DRION P.V., EL AMIRI B., DRION V., PERENYI Z.,
SOUSA N.M. & BECKERS J.F. (2002). Evaluation de l'utilisation du pepsinogène sangun comme bio marqueur de l'intégrité de la muqueuse gastrique chez le porc .1- Historique, physiologie de la muqueuse gastrique et différentes formes de pepsinogènes. *Ann. Méd. Vét.* , 146, pp. 339-346.
- BARBANO D.M., SHERBON J.W., (1984). Cheddar cheese yields in New York. *J. Dairy Sci.*, 67, 1873-1883.
- BARRETT A.J., RAWLINGS N.D., WOESSLER J.F., 1998. Handbook of proteolytic enzymes, Academic Press, Londres, 1666p.
- BARRETT A.J., RAWLINGS N.D., O'BRIEN E.A., 2001. The MDROPS database as a pepsinase information system. *J. Struct. Biol.*, 134, 95-102.
- BELDARRAIN A., ACOSTA N., MONTESINOS R., MATA. M. AND CREMATA J., (2000). Characterization of *Mucor pusillus* rennin expressed in *Pichia pastoris* : enzymic, spectroscopic and calorimetric studies. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31 : 77- 84.
- BOYER P. D** (1971) - The enzymes, 3rd ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- BUNN C.W., MOEWS P.C., BAUMBER M.E., 1971. The crystallography of calf rennin (chymosin). *Proc. Roy. Soc. Lond. ser. B*, 178, 245-258.
- CATTANEO T.M.P, NIGRO F, MESSINA G & GIANGIACOMO R. (1994). Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase. *Milchwissenschaft*, 49, 269–272.
- CAVALCANTI M.T.H., TEIXEIRA M.F.S., LIMA FILHO J.L., AND PORTO A.L.F., 2004. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiosis* sp. *Bioresource Techn.*, 93: 29-35
- CAVALCANTI M.T.H., TEIXEIRA M.F.S., LIMA FILHO J.L., AND PORTO A.L.F., (2004). Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiosis* sp. *Bioresource Techn.*, 93: 29-35
- CHANNE PS. AND SHEWALE JG., (1998). Influence of culture conditions on the formation of milk-clotting protease by *Aspergillus niger* MC4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 11-15
- CHAZARRA S, SIDRACH L, LOPEZ-MOLINA D & RODRIGUEZ-LOPEZ J.N. (2007)- Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, (17) 1393–1400
- CHWEN-JEN SHIEHA, LAN-ANH PHAN THIB, ING-LUNG SHIH (2009) - Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. *Biochemical Engineering Journal* 43 (2009) 85–91
- COLIN O., LAURENT F., VIGNON B., (1992). Variations du rendement fromager en p.te molle. Relations avec la composition du lait et les paramètres de la coagulation. *Lait*, 72, 307-319.

- COLLIN J.C., GRAPPIN R. ET LEGRAET Y., (1977). Etude de la méthode de mesure, selon Berridge, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. *Rev. Lait. Franç.*, **355** : 389- 394.
- Cullen D., Gray G.L., Wilson L.J., Hayenga K.J., Lamsa M.H., Rey M.W., Norton S., Berka R.M., (1987). Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Bio-Technol.*, **5**, 369-376.
- CUVELLIER G.F., (1999). Production des enzymes. In : *Biotechnologie*. Goor. Scriban R., 5^e ed., 345 – 363.
- DA SILVA ALEXANDRA ABREU (2004). Clonage et expression des prochymosines bovines A, B et B S79N chez *Escherichia coli* et *Pichia pastoris*. Etude de la mutation S79N. Thèse de doctorat , INA , Paris Grignon, 199p.
- DANLEY D.E., GEOGHEGAN K.F., 1988. Structure and mechanism of formation of DESMAZEAUD M., SPINNLER E., 1997. Laits et produits laitiers. In « Enzymes en agroalimentaires ». Ed. V. Larreta- Garde. Tech. et Doc. Lavoisier.
- DUNN S.D., (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western-blot by monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.*, **157**, 144-153.
- E. GALA´ N, F. PRADOS, A. PINO, L. TEJADA, J. FERNA´ NDEZ-SALGUERO (2008). Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal* **18**, 93–98.
- EGITO A.S, GIRARDET J.M, LAGUNA L.E, POIRSON C, MOLLE D, MICLO L, HUMBERT G, & GAILLARD J.L .(2007). - Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. *International Dairy Journal* **17**, 816–825
- EI ELAGAMY (2000) - Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: a comparison with buffalo rennet. *J Dairy Res.*, **67**(1): 73-81.
- Emtage J.S., Angal S., Doel M.T., Harris T.J.R., Jenkins B., LILLEY G., LOWE P.A., (1983). Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 3671-3675.
- FADYLOGLU S.,(2001). Immobilization and characterisation of ficin. *Nahrung / Food*,**45**(2): 143-146.
- FAO, 1994. Production Yearbook, **48**, 281p, Rome 1995.
- FAO, 2003. Production Yearbook, **57**, 340p, Rome, 2005.
- FERNANDEZ, O. CASCONI, Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Mucor bacilliformis*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **37** (1992) 283–294.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA E, IMHOF M, SCHLICHOTHERLE-CERNY H, BOSSET, J.O & NUÑEZ M. (2008). [Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with a Cynara cardunculus extract as coagulant](#) . *International Dairy Journal*, *Volume 18, Issue 2*, 147-157

- FERNANDEZ-SALGUERO, J., TEJADA, L., & GOMEZ, R. (2002). Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 464–468.
- FIAT AM and JOLLESP (1989) - **Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects.** *Mol Cell Biochem.*, 87(1): 5-30.
- FINDLAY C.I., STANLEY D.W. & EMMONS D.B. (1984). Chicken pepsin as rennet substitute. *Can. Int. Food Sci. Technol. J.*, 17(2), pp.97-101.
- FOLTMAN B (1981) – *Essays in biochemistry*, 17, 52 – 83.
- Foltmann B., Pedersen V.B., Kauffman D., Wybrandt G., (1979). The primary structure of calf chymosin. *J. Biol. Chem.*, 254, 8447-8456.
- Foltmann B., Pedersen V.B., JACOBSEN H., Kauffman D., Wybrandt G., (1977). The complete amino acid sequence of prochymosin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 2321-2324.
- Franke A.E., Kaczmarek F.S., Eisenhard M.E., Geoghegan K.F., Danley D.E., DE ZEEuw J.R., O'Donnell M.M., Gollaher M.G. Jr., Davidow L.S., (1988). Expression and secretion of bovine prochymosin in *Yarrowia lipolytica*. *Dev. Ind. Microbiol.*, 29, 43-57.
- FUKUMOTO J., TSURU D., YAMAMOTO T., (1967). A rennin-like enzyme from *Rhizopus chinensis*. *Agr. Biol. Chem.*, 31, 710-717.
- GAYA, P., CARRERA, E., MEDINA, M. & NÚÑEZ, M. (1999). Formation of hydrophobic peptides during the manufacture of ewe's milk Manchego cheese using different milk coagulants. *Milchwissenschaft*, 54, 556-558.
- GILDBERG A. & RAA J. (1983) . Purification and characterization of pepsins from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 75 (3), pp. 337-342.
- Goff C.G., Moir D.T., Kohno T., Gravius T.C., SMITH R.A., YAMASAKI E., TAUNTON-RIGBY A., (1984). Expression of calf prochymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 27, 35-46.
- GORDIN S. & ROSENTHAL I. (1978). Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *J. Food Protection*, 41, pp. 684
- GOUSAND J., 1999 : Réacteurs traditionnels à enzymes libres : cas de l'industrie laitière. In: Biotechnologies. Coord. Scriban R., 5^{ème} ed.: 365 – 401
- GOUSAUD J., (1999) : Réacteurs traditionnels à enzymes libres : cas de l'industrie laitière. In: Biotechnologies. Coord. Scriban R., 5^{ème} ed.: 365 – 401.
- GREEN M. L (1972) – Assessment of swine , bovine and chicken pepsins as substitutes for Cheddar cheese making. . *J. Dairy Res.*, 39, 427.
- GREEN M.L. ET STACKPOOLE A., (1975). The preparation and assesment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase-swine pepsine mixture for Cheeddar cheese-making. *J. Dairy res.*, 42: 297 – 312
- GREEN M.L., (1977). Review of the progress of science : milk coagulants. *J. Dairy res.*, 44: 159 – 188.

- GRIPON J.C(1985) – Les enzymes protéolytiques en industrie laitière . In “ Hydrolases et depolymeases”. Coll. Biochimie appliquée. Ed. Gauthiers-Villars – Paris.
- GROSCLAUDE F., (1988). Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité la composition et les aptitudes fromagères du lait. *INRA Prod. Anim.*, 1, 5-17.
- 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, IFREMER, Fr., pp. 51-86.
- GUINEE, T. P., MULHOLLAND, E. O., O'BRIEN, B., & MURPHY, J. J. (2001). Effect of diet quality on the suitability of mid-lactation bovine milk for cheddar cheese
- HAARD N.F. (1994) . Protein hydrolysis in sea foods. In: Shahidi F. & Botta J.R. (Ed.) . Sea foods chemistry, processing technology and quality. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK, pp. 10-13.
- HAARD N.F. , HELBIG N. & FELTHAM L.A.W. (1981). The temperature characteristics of pepsin from two stocks of American smelt (*Osmerus mordax*). In: Proc. Workshop of Labrador coastal offshore region. Newfoundland Institute of Cold Ocean Science, St John's, Canada, pp. 174-196.
- HAARD N.F., SHAMSUZZAMAN K., BREWER 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., pp. 237-241.
- HACINI N. (2007). Filière lait et risques alimentaires. Magvet : Magasine de la production et de la santé animales, 7^{ème} Salon International de l'élevage et du machinisme agricole . 13-15 mai 2007, 22-29.
- HARKKI A., UUSITALO J., BAILEY M., PENTILLA M., KNOWLES J.K.C., (1989). A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio-Technol.*,7, 596-600.
- HASAN TEMIZ, EMIN OKUMUS , UMUT AYKUT, MUHAMMET DERVISOGLU and FEHMI YAZICI (2008). Partial purification of pepsin from turkey proventriculus. *World J Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s11274-008-9678-6.
- HASHEM AM. (1999). Optimization of milk clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. *Bioresour Technol* 1999;70:203–7.
- HAYES MG, OLIVEIRA JC, MCSWEENEY PL, and KELLY AL (2000) - Thermal inactivation of chymosin during cheese manufacture. *J Dairy Res.*, 69(2): 269-79.
- HOFFMAN T (1974)** - Food related enzymes. *Adv. Chem. Ser.* 136:146-185.
- HOFMAN T., SHAW R.,(1964). Proteolytic enzymes of *Penicillium janthinellum*. I. Purification and properties of a trypsinogen-activating enzyme (peptidase A). *Biochim. Biophys. Acta*, 92, 543-557.
- HURTAUD C., RULQUIN H., V.RIT. R.,(1993). Effect of infused volatile fatty acids and caseinate on milk composition and coagulation in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 76, 3011-3020.

- IKONEN, T., MORRY, S., TYRISEVA", A.-M., ROUTTINEN, O., & OJALA, M. (2004). Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content and pH of milk. *Journal of Dairy Science*, 87, 458–467.
- JARMUL I., REPS A., POZNANSKI S. ET ZELAZOWSKA H., (1982). Utilisation du mélange de la pepsine avec la préparation microbienne "Fromase" dans la fabrication des fromages Edam et Kortowski. *Le lait*, 62 : 75 – 86.
- JOHNSON, M. E., CEN, C. M., & JAEGGI, J. J. (2001). Effect of rennet coagulation time on composition, yield, and quality of reduced-fat cheddar cheese. *Journal of Dairy*
- K. ARIMA, J. YU, S. IWASAKI, Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. *Lindt*, KANEDA M. ET TOMINAGA N.,(1975). Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. *J. Biochem. (Tokyo)*, 78(6): 1287 – 1296.
- KARAMI M., EHSANI M.R., MOUSAVI S.M., REZAEI K. , SAFARI M. (2009). Changes in the rheological properties of Iranian UF-Feta cheese during ripening. *Food Chemistry*, 112 (2009) 539–544
- KHAN M.R., BLAIN J.A. ET PATTERSON J.D.E., (1983). Partial purification of *Mucor pusillus* intracellular proteases. *Appl. Envir. Microbiol.*, 45 (1) : 94 – 96.
- Klessen C., Schmidt K.H., Gumpert J., Grosse H.H., Malke H.,(1989). Complete secretion of activable bovine prochymosin by genetically engineered L forms of *Proteus mirabilis*. *Appl. Environ. Microb.*, 55, 1009-1015.
- Kolmer M., Ord T., Ulmanen I., (1991). Expression of recombinant calf prochymosin in mammalian cell culture. *J. Biotechnol.*, 20, 131-140.
- KONUSPAYEVA, G., FAYE, B., & LOISEAU, G., The composition
- LEMIEUX L. ET SIMARD R.E., (1991). Better flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development. *Le lait* 135 : 503 – 504.
- LO PIERO A.R, PETRONE G & PUGLISI I.(2002). Characterization of « lettuce », a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk-clotting. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 50, n. 8, 2439-2443.
- LO PIERO A.R. ET PETRONE G.,(1999). Purification and partial characterization of an ATP-hydrolysing serine protease from lettuce leaves. *Phytochem.*, 51 : 349 – 356.
- LOPES A, TEIXEIRA G, LIBERATO M.C, PAIS M.S & CLEMENTE A.(1998). New vegetal sources of milk clotting enzymes. *Journal of molecular catalysis B : Enzymatic*, vol. 83, p.181.
- LORENTE B.E, BRUTTI C.B, CAFFINI N.O.(2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 52, N. 26, 8182-8189.
- LOW Y.H, AGBOOLA S, ZHAO J, & LIM M.Y (2006). [Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk](#) . *International Dairy Journal*, Volume 16, Issue 4, 335-343
- LUQUET F.M., (1985). Lait et produits laitiers. Vache. Brebis. Chèvre. T2. Ed. Tech. et DOC. LAVOISIER, PARIS.

- M. ADDIS, G. PIREDDA, A. PIRISI (2008). The use of lamb rennet paste in traditional sheep milk cheese production. *Small Ruminant Research* 79 (2008) 2–10
- MACEDO, A., MALCATA, F. X. AND OLIVEIRA, J. C. (1993). The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1725-1739.
- MACEDO, A., MALCATA, F. X. AND OLIVEIRA, J. C. (1993). The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1725-1739.
- MACEDO, A., MALCATA, F. X. AND OLIVEIRA, J. C. (1993). The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1725-1739.
- MACEDO, I. M. Q., C. J. F. FARO, AND E. M. V. PIRES. (1996). Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L.: Action on bovine κ - and β -casein and comparison with chymosin. *J. Agric. Food Chem.* 44:42–47.
- Marston F.A.O., Lowe P.A., Doel M.T., Schoemaker J.M., White S., Angal S., (1984). Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *Escherichia coli*. *Bio-Technol.*, 2, 800-804.
- MARTIN P., COLLIN J.C., CARNOT P., RIBADEAN B., DUMAS ET MACQUOT G., (1982). Méthodes d'analyse quantitative des extraits de présure et de pepsine bovine "détermination des teneurs en enzymes actifs" in use of enzymes in food technology. Dupy P. Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier. Symposium Intern. Versaille, 287- 289.
- MARTIN P., RAYMOND M.N., BRICAS E., RIBADEAU DUMAS B. (1980). Kinetic studies on the action of *Mucor pusillus*, *Mucor Miehei* acid proteases and chymosins A and B on a synthetic chromophoric hexapeptide. *Biochim. Biophys. Acta*, 612, 410-420.
- MARTINS A P L, VASCONCELOS M M P AND SOUSA R B (1996). Thistle (*Cynara cardunculus* L.) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. *Le Lait*. 76 473–477.
- MARTIN, P., FERRANTI, P., LEROUX, C., ADDEO, F., (2003). Non-bovine caseins quantitative variability and molecular diversity. In: Fox, P.F., Mc Sweeny (Eds.), *Advances in Dairy Chemistry, Proteins*, vol. 1, 3rd ed, pp. 277–310, Part A.
- Mellor J., Dobson M.J., Roberts N.A., Tuite M.F., Emtage J.S., WHITE S., LOWE P.A., PATEL T., KINGSMAN A.J., KINGSMAN S.M., (1983). Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 24, 1-14.
- MIETTON B., DERMAZEAUD M., DEROISSART H. ET WEBER F., 1994 : Transformation du lait en fromage. In : Bactéries lactiques. T2. Coord. Deroissart H. et Luquet F.M. Ed. Loriga
- MIETTON B. (1991). *Methods in Enzymology*, 19 (1970) 446–459.
- MOHAMED AHMED, I.A., MORISHIMA, I., BABIKER, E.E., MORI, N., Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds, *Food Chemistry* (2008), doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.072

- MOHANTY AK, MUKHOPADHYAY UK, KAUSHIK JK, GROVER S, and BATISH VK (2003) Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Dairy Res*, February 1, 70(1): 37-43
- MOLL M. & MOLL N. (1998). *Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques*. Ed. Dunod, Paris, 218p.
- MUNOZ R., GARCIA J. L., CARRASCOSA A. V., AND GONZALEZ R., (2004). Cloning of the authentic bovine gene encoding pepsinogen A and its expression in microbial cells. *Appl. Envir. Microb.*, 70 (5) : 2588-2595.
- NG-KWAI-HANG, K. F., POLITIS, I., CUE, R. I., & MARZIALI, A. S. (1989). Corrélations between coagulation properties of milk and cheese yielding capacity and cheese composition. *Journal of Canadian Institute of Food Science and Technology*, 22, 291–294.
- Nishimori K., Kawaguchi, Y., Hidaka, M., Uozumi, T., Beppu, T., (1982). Expression of cloned prochymosin gene sequence in *Escherichia coli*. *Gene*, 19, 337-344.
- Nishimori K., Shimizu, N., Kawaguchi, Y., Hidaka, M., Uozumi, T., Beppu, T., (1984). Expression of cloned calf prochymosin cDNA under control of the tryptophan promoter. *Gene*, 29, 41-49.
- NODA M. & MURAKAMI K. (1981). Studies of proteinases from the digestive organs of sardine. II. Purification and characterization of two acid proteases from the stomach. *Biochem. Biophys. Acta*, 658 (1), pp. 27-34.
- NOOR-DEVELIET P.E., GIST-BROCADES N.N. ET DELFT N.C.D., (1983). Les enzymes alimentaires : utilisation et innocuité. *Microbiol. Alim. Nut.*, 1 : 1 – 5.
- NUNGARAY A.J. & LEGOFFIC F. (1996). Etude d'une lipase hépatique et de la pepsine d'un requin benthique en vue de la valorisation de ses viscères. Utilisation des pyridines photoactivables pour l'immobilisation de protéines sur membranes. INIST-CNRS, Travaux universitaires, Univ.de Paris06, Paris, Fr.
- O'BRIEN B, RYAN G, MEANEY WJ, MCDONAGH D, and KELLYA (2002)- Effect of frequency of milking on yield, composition and processing quality of milk. *J Dairy Res.*, 69(3): 367-74.
- OLSON, N.F., (1995). Cheese. In *Enzymes, Biomass, Food & Feed, Biotechnology*,
- ONER M.D & AKAR B. (1993). Separation of the pteolytic enzymes from fig tree latex and its utilisation in Gaziantep cheese production. *Lebensm. -Wiss. U. -Technol.*, 26, 318-321
- OSTERSEN, S., FOLDAGER, J., & HERMANSEN, J. E. (1997). Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 64, 207–219.
- PAEZ DE LEON L., PINZON G. & OTAIZA VASQUEZ E. (1995). Purification and assay of chicken pepsin. *Acta Cient. Venez.* , 46 (4), pp. 237-241.
- Parente D., DE Ferra F., Galli G., Grandi, G., (1991). Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 77, 243-250.
- PARK H, YAMANAKA N, MIKKONEN A, KUSAKABE I. & KOBAYASHI H. (2000). Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, Biotechnology*

- PARK Y.W., JUAREZ M. RAMOS M., and HAENLEIN G.F.W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68 (2007) 88–113
- PEREIRA C.L.I, GOMES E.O, GOMES A.M.P & MALCATA F. X (2008)- [Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture](#) . *Food Chemistry, Volume 108, Issue 3*, 862-868.
- PEREIRA C.L.I, GOMES E.O, GOMES A.M.P & MALCATA F. X (2008)- [Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture](#) . *Food Chemistry, Volume 108, Issue 3*, 862-868
- PICON A, GAYA P, MEDINA M & NUNEZ M. (1995). Kinetics of milk coagulation by mixtures of cyprosin and chymosin. *Milchwissenschaft*, 50, 393–395.
- PINO, A., PRADOS, F., GALÁN, E., MCSWEENEY, P.L.H., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., Proteolysis of camel milk: A meta-analysis of the literature data, *Journal of Food Composition and Biochemistry*, 64, 931–939.
- PINO, A., PRADOS, F., GALÁN, E., MCSWEENEY, P.L.H., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., (2008), Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International* doi:10.1016/j.foodres.2008.12.009
- QUEZEL P. & SANTA S. (1962). La flore Nouvelle de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris, Tome 1 et 2.
- RAMET J.P., (1981). Study of technological properties of a new thermosensitive coagulant of *Mucor miehei*. Marscall Italian and Specialty cheese seminars.
- RAMET J.P., 1990 : Les agents de transformation du lait. In: Fromage. Coord. Eck A. Tech. et Doc. Lavoisier, Paris : 101 – 105.
- RAMET J.P., (1997). Les agents de transformation du lait. In « Le fromage ». Paris, Ed. Tech. and Doc. Lavoisier (3^e édition), p.p. 165-172.
- RAO M.B., TANKSAL M., GHTAGE M.S. ET DESHPANDE V.V., (1998). Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbio. Mol. Biol. Rev.*, 62 (3): 597 – 635.
- RAO M.B., TANKSAL M., GHTAGE M.S. ET DESHPANDE V.V., (1998). Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbio. Mol. Biol. Rev.*, 62 (3): 597 – 635.
- RAWLINGS N.D., BARRETT A.J., (1994). Families of cysteine peptidases. *Method Enzymol.*, 244, 461-486.
- REECE P. (1988). Recovery of proteases from fish waste. *Process. Biochem.* , 6, pp.62-66.
- REPS A., POZNANSKI S., BABICHOWSKI A. ET JEDRYCHOWSKI L., (1979). Propriétés des substituts de présure fabriqués à partir de *Mucor miehei*. *Le lait*, 1, 580 – 582.
- SARDINAS J.L., 1968. Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. *Appl. Microbiol.*, 16, 248-253. *Science*, 84, 1027–1033
- SHAMSUZZAMAN K. & HAARD N.F. (1984) . Purification and characterization of a chymosin like protease from gastric mucosa of harp seal (*Paophilus groenlandicus*). *Can. J. Biochem. and Cell. Biology*, 62, pp.699-708.

- SIDRACH L, GARCIA-CANOVAS F, TUDELA J, & NEPTUNO RODRIGUEZ-LOPEZ J.(2005).Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus*): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, vol. 66, 41-49.
- SILVA S.V, & MALCATA, F.X. (2000). Action of cardosin A from *Cynara humilis* on ovine and caprine caseinates. *Journal of Dairy Research*, 67, 449–457.
- SINGH, T. K., DRAKE, M. A., & CALDWALLADER, K. R. (2003). Flavor of Cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 139–162.
- SMEETS S.R., 1995: Enzyme coagulation. Dairy technology paper, 5 (2): 14 – 16.
- SOMKUTI G.A. ET BABEL F.J., (1968). Purification and properties of *Mucor pusillus* acid protease. *J. Bact.*, 95 (4) : 1407 – 1414.
- SOUSA M.J & MALCATA, F.X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*, 82, 151–170.
- SOUSA, M. J., & MALCATA, F. X. (1997). Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical and proteolysis characteristics of ovine cheese. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 74–81.
- STERNBERG M., (1976). Microbial rennets. In: advances in applied microbiology. Ed. Perlman D. Academic Press.
- STERNBERG M., 1971. Crystalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. *J. Dairy Sci.*, 54, 159-167
- STERNBERG M., 1976. Microbial rennets. *Adv. Appl. Microbiol.*, 20, 135-157.
- TAVARES J.F.P, BAPTISTA J.A.B AND MARCONE M.F (1997). Milk coagulating enzymes of tuna fish wate as a rennet substitute. *International journal of food science and nutrition*, 48, 169-76.
- TEJADA L, ABELLÁN A, CAYUELA J, MARTÍNEZ-CACHA A, & FERNÁNDEZ-SALGUERO J. (2008)- [Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant](#) . *International Dair y Journal*, Volume 18, Issue 2,139-146
- Tsuchiya K., Gomi K., Kitamoto K., Kumagai C., Tamura G., (1993). Secretion of calf chymosin from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biot.*,40, 327-332.
- TYRISEVA, A.-M., VAHLSTEN, T., RUOTTINEN, O., & OJALA, M. (2004). Noncoagulation of milk in Finnish Ayrshire and Holstein-Friesian cows and effect of herd on milk coagulation ability. *Journal of Dairy Science*, 87, 3958–3966.
- UCHIKOBA T & KANEDA M.(1996). Milk clotting activity of cucumisin, a plant serine protease from Melon fruit. *Appl. Biochem. Biotechnol.*(56), 325-330.
- UCHIYAMA H., UOZUMI T., BEPPU T., ARIMA K., (1980). Purification of prorennin mRNA and its translation *in vitro*. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1373-1381.
- UMAR DAHOT, M., YAKOUB KHAN, M., & MEMON, A. N. (1990). Screening of some Pakistani plants for milk clotting activity. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 3, 284–286.
- Uusitalo J.M., Nevalainen K.M.H., Harkki A.M., Knowles J.K.C., Penttila M.E., (1991). Enzyme production by recombinant *Trichoderma reesei* strains. *J. Biotechnol.*, 17, 35-50.

- van den Berg J.A., van der Laken K.J., Van Ooyen A.J.J., Renniers T.C.H.M., Rietveld K., Schaap A., Brake A.J., Bishop R.J., Schultz K., Moyer D., RICHMAN M., SHUSTER J.F., (1990). *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression and secretion of prochymosin. *Bio-Technol.*, 8, 135-139.
- VERISSIMO P, RAMALHO-SANTOS M, FARO C, & PIRES E. (1998). A comparative study on the aspartic proteinases from different species of *Cynara*. *Aspartic Proteinases*, 436, 459–463
- VIOQUE M, GÓMEZ R, SÁNCHEZ E, MATA C, TEJADA L AND FERNÁNDEZ-SALGUERO J (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 451–456.
- Ward M., Wilson L.J., Kodama K.H., Rey M.W., Berka R.M., (1990). Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Bio-Technol.*, 8, 435-440.
- WEDHOLM, A., LARSEN, L. B., LINDMARK-MANSSOM, H., KARLSSON, A. H., & ANDRE´ N, A. (2006). Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 3296–3305.
- ZHAO J., CHEN S. ET AGBOOLA S.O.,(2003). Effect of starter culture on the biochemical and sensory properties of ovine cheese manufactured with a plant coagulant. *Australian J. of Dairy Techn.* 58 (2), p. 219.
- ALAIS C., (1984). Le lait. Editions Sepiac, Paris, 814 p.
- ALAM SI, DUBE S, REDDY GSN, BHATTACHARYA BK, SHIVAJI S, SINGH L., (2005). Purification and characterization of extracellular protease produced by *Clostridium* sp. from Schirmacher oasis, Antarctica. *Enzyme Microb Technol* 36:824–831
- ALESSANDRO M AND FEDERICO F.(1981). Partial purification and characterization of a yeast extracellular acid protease. *J Dairy Sci* ,1980;63:1397–402.
- ANONYMOUS (2002). Statistiques du Ministère du commerce (Alger).
- ANONYMOUS (2005). Statistiques du Ministère du commerce (Alger).
- ANSTRUP K., (1980). Proteinases. In: microbial enzymes and bioconversions. Ed. Rose A.H. Academic Press, 93-108.
- ARIMA K, YU J AND IWASAKI S (1970). Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In *Methods in Enzymology*, vol. 19, pp 446–460. Perlmann G E and Lorand L,
- ARIMA K., IWSAKI S., TAMURA G.,(1967).Milk clotting enzyme from microorganisms. ParT I. Screening teSt And the identification of the potent fungus. *Agr.Biol.Chem.*, 31, 540-545.
- ARECES L.B., BONINO M.B.I., PARRY M.A.A., FRAILE E.R., FERNANDEZ H.M. & CASCONO O. (1992). Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* , 37 , pp. 283-294
- BASHIR H. YOUSIF, DONALD J. MCMAHON2 & KHALID M. SHAMMET (1996). Milk-clotting Enzyme from *Solanum dobium* Plant. ht. *Dairy Journal*, 6 , 637-644

- BELYAUSKAITE I.P., PALUBINSKAS V.J., ANCHEUKO O.E., VESA V.S., AND GLEMZHA A.A.,(1980). Purification and some properties of the extracellular acid proteases from *Mucor renninus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 2 : 37- 44.
- BELYAUSKAITE I.P., PALUBINSKAS V.J., ANCHEUKO O.E., VESA V.S., and GLEMZHA A.A.,(1980). Purification and some properties of the extracellular acid proteases from *Mucor renninus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 2 : 37- 44.
- BERRIDGE, N. J. (1952). An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *Journal of Dairy Research*, 9, 328–329.
- BRULE G. ET LENOIR J.,(1990). Les mécanismes généraux de la transformation du lait en fromage. In : *Fromage. Coord. Eck, Ed.Tech. et Doc. Lavoisier, Paris*, 1 – 21.
- BRUNO M.A., PARDO M.F., CAFFINI N.O. ET LOPEZ L.M.I., (2002). Purification of a new endopeptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Acta Farm. Bonaerense*, 21 (1) : 51 – 56.
- CASTILLO M., PAYNE F.A., HICKS C.L., LAENCINAA J., LOPEZ M.B. (2002). Effect of calcium and enzyme in cutting time prediction of coagulating goats' milk using a light scattering sensor *International Dairy Journal* , 12 , 1019–1023.
- CAVALCANTI M.T.H., TEIXEIRA M.F.S., LIMA FILHO J.L., AND PORTO A.L.F., 2004. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardia* sp. *Bioresource Techn.*, 93: 29-35
- CHANNE PS. AND SHEWALE JG., (1998). Influence of culture conditions on the formation of milk-clotting protease by *Aspergillus niger* MC4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 11-15
- CHANNE PS. AND SHEWALE JG.,(1998). Influence of culture conditions on the formation of milk-clotting protease by *Aspergillus niger* MC4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 11-15
- CHWEN-JEN SHIEHA, LAN-ANH PHAN THIB, ING-LUNG SHIH (2009) - Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis natto*. *Biochemical Engineering Journal* 43 (2009) 85–91
- COLLIN J.C., GRAPPIN R. AND LEGRAET Y.,(1977). Étude de la méthode de mesure, selon Berridge, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. *Rev. Lait. Franç.*, 355 : 389- 394.
- CORDEIRO M., JACOB E., PLTHAN Z., DAIS M.S., BRODELIUS P.E.,(1992). Milk-clotting and proteolytic activities of purified Cynarases from *Cynara cardunculus* - a comparison to chymosin. *Milchwissenschaft*, vol. 47, p.p. 683-687.
- D'AMBROSIO A., ROSSANO 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 : 145-150.
- DESMAZEAUD M., SPINLER E.,(1997). Lait et produits laitiers. In « *Enzymes en agroalimentaires* ». Ed. V. Larreta- Garde. Tech. et Doc. Lavoisier.
- EGITO A.S, GIRARDET J.M, LAGUNA L.E, POIRSON C, MOLLE D, MICLO L, HUMBERT G, & GAILLARD J.L .(2007). - Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. *International Dairy Journal* 17, 816–825

- ERDEM, Y. K. (1997). The affect of calcium chloride concentration and pH on the clotting time during the renneting of milk. *Gida*, 22, 449–455.
- ESAWY MONA A. and COMBET-BLANC YANNICK (2006). Immobilization of *Bacillus licheniformis* 5A1 milk-clotting enzyme and characterization of its enzyme properties. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22:197–200
- ESCOBAR J.M. ET BARNETT S.M. (1993). Effect of comsuption and agitation rates in the production of *Mucor miehei* protease. *Enzyme Microb. Technol.*, 15,1009-1013.
- ESCOBAR J.M. ET BARNETT S.M. (1995). Synthesis of acid protease from *Mucor miehei*: Integration of production and recovery. *Process Bioch.*, 30,8,695-700.
- FABIENNE GUERARD (1987). une utilisation des enzymes proteolytiques extraites des viscères de poissons :la coagulation du lait. *Rev. Trav.. Inst. Pêches marit.*, 49 (3 et 4) : 199- 203, 1985
- FERNANDEZ-LAHOURE H M, FRAILE E R AND CASCONO O (1998). Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. *Journal of Biotechnology* 62 83–93.
- FOX P.F. ET WHITAKER J.R.,(1977). Isolation and charaterization of sheep pepsin. *Biochem. J.*, 161 : 389 – 398.
- FUKUMOTO J., TSURU D., YAMAMOTO T.,(1967). A rennin-like enzyme from *Rhizopus chinensis*. *Agr. Biol. Chem.*, 31, 710-717.
- GARNOT P. ET MARTIN P.,(1980). Présure, composition, activité, son role en fromagerie. *Technique Laitière* 930 (3) : 27- 30.
- GORDIN S. & ROSENTHAL I. (1978). Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *J. Food Protection*, 41, pp. 684
- GOURSAND J., (1999). Réacteurs traditionnels à enzymes libres : cas de l'industrie laitière. In: *Biotechnologies*. Coord. Scriban R., 5ème ed.: 365 – 401
- GREEN M.L. ET STACKPOOLE A.,(1975). The preparation and assesment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase-swine pepsine mixture for Cheeddar cheese-making. *J. Dairy res.*, 42: 297 – 312
- GUERARD F. & LEGAL Y. (1989). Electrophoretic study of the caseinolytic activity of a pepsin from the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* , 91(3) , pp. 425-435 .
- HASHEM AM (2000). Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Penicillium oxalicum*. *Bioresour Technol* ;75: 219–22.
- HAVLIS J, THOMAS H, SEBELA M, SHEVCHENKO A. (2003). Fast-Response Proteomics by Accelerated In-Gel Digestion of Proteins. *Anal. Chem.*, 75(6);1300-1306
- HOFMANN T., SHAW R.,(964). Proteolytic enzymes of *Penicillium janthinellum*. I. Purification and properties of a trypsinogen-activating enzyme (peptidase A). *Biochim. Biophys. Acta*, 92, 543-557.
- IKASARI L, MITCHELL DA. (1996). Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme Microb Tech* 1996; 19:171–5.

-
- IWASAKI S., TAMURA G. ET ARIMA K.,(1979). Milk clotting enzyme from microorganisms. Part II – the enzyme production and the properties of crude enzyme. *Agr. Biol.*, 31 (5): 546 – 551.
- KAWAI M.(1971). Studies on milk clotting enzyme produced by Basidiomycetes Part III. Partial purification and some properties of the enzyme produced by *Irpeus lacteus*. *Fr. Agric Biol Chem*, 1971;35: 1517–25.
- KHAN M.R., BLAIN J.A. ET PATTERSON J.D.E.,(1979). Extracellular protease of *Mucor pusillus*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 37 (4) : 719 – 724.
- KRAUSE W., PATZSH M., HASSAN Z.M.R. and HAUFE T.,(1998). Substrate and binding specificity of aspartic protease with milk clotting properties. *Nahrung* 42, Nr. 3/4: 162-165.
- KUMAR S., SHARMA N.S., SAHARAN N.R., AND SINGH R.,(2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae* : purification and characterization. *Process Biochemistry*, 40: 1701-1705.
- KUMAR S., SHARMA N.S., SAHARAN N.R., AND SINGH R.,(2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae* : purification and characterization. *Process Biochemistry*, 40: 1701-1705.
- LAEMMLI UK.,(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- LAGOUEYTE, N., LAGAUE, A., & TARODO DE LA FUENTE, B. (1995). Rheological properties of renneted reconstituted milk gels by piezoelectric Viscoprocess: Effects of temperature and calcium phosphate. *Journal of Food Science*, 60, 1344–1363.
- LENOIR J., AUBERGER B. ET GRIPPON J.C.,(1979). Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. III. Caractérisation d'une protéase acide. *Le lait* 585 – 586, 244 – 268.
- LEVADOUX W., JOHNSON M. ET ANDER G.,(1989). Monitoring the degradation of commercial microbial rennet preparations. *J. Dairy Sci.*, 72 (3):627 – 634.
- LO PIERO A.R., PETRONE G. ET PUGLISI I.,(2002). Characterization of «lettucine », a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk-clotting. *J. Agric. Food. Chem.*, 50 (8): 2439 – 2443.
- LOPEZJ. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus*): enzymatic
- LORENTE B.E, BRUTTI C.B, CAFFINI N.O.(2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 52, N. 26, 8182-8189.
- LORENTE B.E, BRUTTI C.B, CAFFINI N.O.(2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agriculture and Fodd Chemistry*, Vol. 52, N. 26, 8182-8189.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J.; FARR A.I. AND RANDALL R.J.,(1951). Protein measurement with the Follin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, N°193: 265- 275.
- MADSEN J.S. AND QUIST K.B.,(1997). Hydrolysis of milk protein by a *Bacillus licheniformis* protease specific for acidic aminoacid residues. *J. Food Sci.*, 62 (3) : 579-582.
-

- MAHESHWARI R. BHARADWAJ G. ET BHAT M.K., (2000). Thermophilic fungi : their physiology and enzymes. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 64 (3) : 461 – 488.
- MATOUB L., 2000 : Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33). Mémoire de Magister. Sciences alimentaires. I.N.A. El-Harrach.
- MIETTON B., DERMAZEAUD M., DEROISSART H. ET WEBER F., (1994). Transformation du lait en fromage. In : Bactéries lactiques. T2. Coord. Deroissart H. et Luquet F.M. Ed. Loriga
- NAJERA A.I., RENOBLES M., AND BARRON L.R., (2003). Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk : a multifactorial study. *Food Chem.*, 80 : 345-352.
- OLSON, N.F., (1995). Cheese. In *Enzymes, Biomass, Food & Feed. Biotechnology*, Vol. 9 eds Rehm, H.J. & Reed, G. pp. 353±384. Weinheim. VCH.
- ONER M.D & AKAR B. (1993). Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilisation in Gaziantep cheese production. *Lebensm. -Wiss. U. -Technol.*, 26, 318-321
- PAEZ DE LEON L., PINZON G. & OTAIZA VASQUEZ E. (1995). Purification and assay of chicken pepsin. *Acta Cient. Venez.* , 46 (4), pp. 237-241.
- PASSOS, E. F., MONTEIRO, P. S., OLIVEIRA, R. C., MARTINS, J. G. O., ALVES, H. G., & BRANDAO, S. C. C. (1999). Predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production using a heated thermistor. *Journal of Food Science*, 64, 879–882.
- POZA M., SIEIRO C., CARREIRA L. AND BARROS-VELAZQUEZ J., (2003). Production and characterization of the milk-clotting protease of *Mixococcus xanthus* strain 422. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 691- 698.
- PREETHA S. AND BOOPATHY R., (1997). Purification and Characterization of a milk-clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *W.J. Microb. Biotechn.* 13: 673-678.
- properties of cynarase A. *Phytochemistry*, vol. 66, 41-49.
- RAMET J.P., (1990). Les agents de transformation du lait. In: *Fromage*. Coord. Eck A. Tech. et Doc. Lavoisier, Paris : 101 – 105.
- RAMET J.P., (1997). Les agents de transformation du lait. In « *Le fromage* ». Paris, Ed. Tech. and Doc. Lavoisier (3e édition), p.p. 165-172.
- SARDINAS J.L., (1968). Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. *Appl. Microbiol.*, 16, 248-253.
- SHEVCHENKO, M. WILM, O. VORM, AND M. MANN. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 68:850-858 (1996)
- SIDRACH L, GARCIA-CANOVAS F, TUDELA J, & NEPTUNO RODRIGUEZ-SILVA S.V, & MALCATA, F.X. (2000). Action of cardosin A from *Cynara humilis* on ovine and caprine caseinates. *Journal of Dairy Research*, 67, 449–457.
- SOMKUTI G.A. AND BABEL F.J., (1968). Purification and properties of *Mucor pusillus* acid
- STERNBERG M., (1971). Crystalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. *J. Dairy Sci.*, 54, 159-167.

- TAVARES J.F.P, BAPTISTA J.A.B and MARCONE M.F (1997). Milk coagulating enzymes of tuna fish waste as a rennet substitute. *International journal of food science and nutrition*, 48, 169-76.
- THAKUR M S, KARANTH N G AND KRISHNA N (1990). Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32 409–413.
- TUBESHA Z. A and AL-DELAIMI K .S (2003). Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. *International Journal of Dairy Technology*. Vol 56, No 4 , 237 – 241.
- WYNNE, M.G. AND YADA, R.Y.,(1991). Isolation of *Mucor miehei* and *Mucor pusillus* aspartic proteinases from partially purified sources using preparative isoelectric focussing. *Journal of Food Biochemistry* 15, 347-366.
- YAMASHITA T, HIGASHI S, HIGASHI T, MACHIDA H, IWASAKI S, NISHIYAMA M and BEPPU T. (1994). Mutation of a fungal aspartic proteinase, *Mucor pusillus* rennin to decrease thermostability for use as a milk coagulant. *Journal of biotechnology*, 32, 17-28.
- AMIZA A. and OWUSU APENTEN R.K. (2002). A Single Step Purification of aspartic-Like Proteinase from Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Journal of Biological Sciences* 2 (9): 591-595.
- ARUNCHALAM K. & HAARD N.F. (1985). Isolation and characterization of pepsin from polar cod (*Boreogadus saida*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 80, pp. 467- 473.
- BOHAK Z. (1969). Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *The Journal of Biological Chemistry*, 244 (17), pp. 4638 – 4648.
- BONFATTI V., GRIGOLETTO L., CECCHINATO A., GALLO, L. and CARNIER P. (2008). Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *Journal of Chromatography A*, 1195, 101–106
- BREWER P. , HELBIG N. & HAARD N.F. (1984) . Atlantic cod pepsin. Characterization and use as a rennet substitute. *Can. Int. Food Sci. and Technol. J.*, 17, pp. 38 – 43.
- BRULE G. & LENOIR J. (1990). Les mécanismes généraux de la transformation du lait en fromage .In : Eck A. (coord.). *Le fromage*. Ed. Tec. & Doc. , Lavoisier, Paris, pp.1-21.
- CASTILLO M., PAYNE F.A., HICKS C.L., LAENCINAA J., LOPEZ M.B. (2002). Effect of calcium and enzyme in cutting time prediction of coagulating goats' milk using a light scattering sensor *International Dairy Journal* , 12 , 1019–1023.
- D'AMBROSIO A., ROSSANO R., UNGARO N. & RICCIO P. (2003). Proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from the crustaceans *Munida*. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22 (3-4), pp. 145-150.
- ECK A. (1990). *Le fromage*. Ed. Tec. & Doc. , Lavoisier , Paris , 2ème éd. , 539 p.
- EL-BELTAGY A.E. , EL-ADAWY T.A. , RAHMA E.H. & EL- BEDAWAY A.A. (2004) .Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Food Chemistry*, 86, (1), pp. 33-39.

- ELEYA, M. M. O., BANON, S. D., & HARDY, J. (1995). A comparative study of pH and temperature effects on the acidic coagulation of milks from cows, goats, and sheep. *Journal of Dairy Science*, 78, 2675-2682.
- FINDLAY C.I., STANLEY D.W. & EMMONS D.B. (1984). Chicken pepsin as rennet substitute. *Can. Int. Food Sci. Technol. J.*, 17(2), pp.97-101.
- GILDBERG A. & RAA J. (1983) . Purification and characterization of pepsins from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 75 (3), pp. 337-342.
- GILDBERG A. (1988). Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 91 (3), pp. 425-435.
- GILDBERG A., OLSEN R.L. & BJARNASON J.B. (1990). Catalytic properties and chemical composition of pepsins from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 96, pp.323-330.
- GLICK D. , AUER H. , RICH D. , KAWAI M. & KAMTH A. (1986). Pepsinogen activation: Genesis of the binding site. *Biochem.* , 25, pp. 1858
- GLICK D., SHALITIN Y. & HILT C. (1989). Studies on the irreversible step of pepsinogen activation. *Biochem.* , 28, pp. 2626
- GORDIN S. & ROSENTHAL I. (1978). Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *J. Food Protection*, 41, pp. 684
- HAARD N.F., SHAMSUZZAMAN K., BREWER 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.*, pp. 237-241.
- HAARD, N.F., 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *J. Aquat. Food Product Technol.*, 1: 17-35.
- LOPES A, TEIXEIRA G, LIBERATO M.C, PAIS M.S & CLEMENTE A.(1998). New vegetal sources of milk clotting enzymes. *Journal of molecular catalysis B : Enzymatic*, vol. 83, p.181.
- NUNGARAY A.J. & LEGOFFIC F. (1996). Etude d'une lipase hépatique et de la pepsine d'un requin benthique en vue de la valorisation de ses viscères. Utilisation des pyridines photo activables pour l'immobilisation de protéines sur membranes. INIST-CNRS, Travaux universitaires, Univ.de Paris06, Paris, Fr.
- PAEZ DE LEON L., PINZON G. & OTAIZA VASQUEZ E. (1995). Purification and assay of chicken pepsin. *Acta Cient. Venez.* , 46 (4), pp. 237-241.
- PERES G. (1981). Enzymologie digestive : les protéases, l'amylase, les enzymes chitinolytiques, les laminarases. In : Fontaine M. (Ed.). *Nutrition des poissons. Actes du Colloque CNERNA, Paris*, pp. 55-67.
- GREEN M.L. (1972). Assessment of swine, bovine and chicken pepsins as rennet substitutes for Cheddar cheese making. *J. of Dairy Res.*, 39, pp. 261
- GUERARD F. (1987). Une utilisation des enzymes protéolytiques extraites des viscères de poissons : La coagulation du lait. *Rev. Trav. Inst.Pêches marit.*, 49 (3et4), pp. 199-203.

- GUERARD F. & LEGAL Y. (1989). Electrophoretic study of the caseinolytic activity of a pepsin from the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* , 91(3) , pp. 425-435 .
- KRAUSE W., PATZSH M., HASSAN Z.M.R. and HAUFE T.,(1998). Substrate and binding specificity of aspartic protease with milk clotting properties. *Nahrung* 42, Nr. 3/4: 162-165.
- NAJERA A.I., RENOBLES M., AND BARRON L.R.,(2003). Effects of pH, temperature, $CaCl_2$ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk : a multifactorial study. *Food Chem.*, 80 : 345-352.
- NODA M. & MURAKAMI K. (1981). Studies of proteinases from the digestive organs of sardine. II. Purification and characterization of two acid proteases from the stomach. *Biochem. Biophys. Acta*, 658 (1), pp. 27-34.
- PAQUET D. (1977). Etude d'une protease acide produite par *Mucor meihei*. Thèse de Doctorat, Bioch., Univ. Nancy 1, France , 56-82
- PREETHA S. AND BOOPATHY R.,(1997). Purification and Characterization of a milk-clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *W.J. Microb. Biotechn.* 13: 673-678.
- RAMET J.P. (1985). La fromagerie, les variétés de fromages du bassin méditerranéen. Etude FAO, Production et santé animale, Roma, Italia, N° 48, 187p.
- REECE P. (1988). Recovery of proteases from fish waste. *Process. Biochem.* , 6, pp.62-66.
- RIFAAT I.D. , EL-SHIBINY S. , ABD- SALAM M. & FAHMI A.H. (1970) . Studies on milk clotting enzymes from higher plants. *J. Dairy Sci.*, 23(3), pp. 151-154.
- SANCHEZ-CHIANG L., CISTERNAS E. & PONCE O. (1987). Partial purification of pepsins from adulte and juvenile salmon fish (*Oncorhynchus keta*). Effect of NaCl on proteolytic activities. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87 (4), pp. 793-797.
- SCOTT R. (1979). "Rennets" and cheese. In: Wiseman (Ed.). *Topics in enzyme and fermentation. Biotechnology*, 3, pp .109-155.
- SHAMSUZZAMAN K. & HAARD N.F. (1983) . Evaluation of harp seal gastric protease as a rennet substitute for Cheddar cheese. *J. of Food Science*, 48, pp. 179-182.
- SHAMSUZZAMAN K. & HAARD N.F. (1984) . Purification and characterization of a chymosin like protease from gastric mucosa of harp seal (*Paophilus groenlandicus*). *Can. J. Biochem. and Cell. Biology*, 62, pp.699-708.
- SIBOUKEUR O., MATI A et HESSAS B. (2005). Amélioration de l'aptitude a la coagulation du lait camelin (*Camelus dromadarius*) : utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. *Cahiers d'étude te de recherches francophones Agricultures*, Ed John Libbey, 5(14), 473-478.
- TANJI M., KAGEYAMA T. & TAKAHASHI K. (1988). Tuna pepsinogens and pepsins. Purification and characterization and amino acids sequences. *European Journal of Biochem.* , 117, pp. 251-259.
- TWINING S.S., ALEXANDER P.A. & GLICK D.M. (1983). A pepsinogen from rainbow trout. *Comp. Biochem. And Physiol.*, 75, pp. 109-112.

- 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.
- AFNOR, (1986). Contrôle de la qualité des produits laitiers. 222p.
- ALAIS C. , (1984). Science du lait : principes des techniques laitières. Paris, Ed. Sepaic (4e édition), 814p.
- BARBOSA M., (1985). Serra Da Estrela cheese. Production and utilization of ewe and goat milk. FIL/IDF, 133-134.
- BARBOSA M. , VALLES E. , VASSAL C. , MOCQUOT G. ,(1976). L'utilisation de l'extrait de *Cynara cardunculus* comme agent coagulant en fabrication de fromage à pâte molle et à pâte cuite. Le lait, vol. 551, p.p. 1-17.
- CARRERA E., GAYA P. MEDINA M. et NUNEZ M., (1995). Formation of hydrophobic peptides during the manufacture of cheese from ewe, goat and cow milk. Production and utilization of ewe and goat milk. Proceeding of the IDF. CIRVAL Seminar. Greece, 19-21 october, 191-193.
- CHEFTEL J.C. , CHEFTEL H. , BESANCON P. ,(1977). Laits et produits laitiers. In « Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments ». Paris, Ed. Tech. et Doc. Lavoisier, 801p.
- COGAN TM and REA MC (1996). Pottiguese and Spanish artisanal cheese In COGAN TM and REA MC . Artisanal European cheese – cudies, Brussels, Belgium. European commission (EUR 16788 EN).
- CORDEIRO M. , JACOB E. , PLTHAN Z. , DAIS M.S. , BRODELIUS P.E. , (1992). Milk clotting and proteolytic activities of purified Cynarases from *Cynara cardunculus* - a comparaison to chymosin. Milchwissenschaft, vol. 47, p.p. 683-687.
- COULON J.-B., HURTAUD C, REMOND B et, VERIT R.(1998). Facteurs de variation de la proportion de cas.ines dans les prot.ines du lait de vache. INRA Prod. Anim., , 11 (4), 299-310.
- HAMAMMA A. C. et BAYI M., (1991). Composition and microbiological profil of two marocain traditional products : raib and j'ben. J. Sci. technology, 44, 15-20.
- JELIN P et RENZ-SCHAUEN., (1989). Qurg manufacturing innovation and their effect on quality nutritive value, and consumer acceptance. Food Technol., 24, 74-80.
- KRAMER A., (1960). A rapid method for determining significance of differences from rank sums. Food technology, Vol.14, p.p.576-581.
- LUQUET F.M.,(1985). Lait et produits laitiers, vache, brebis, chèvre. Tome II. Ed. Tech. Doc. Apria. France. 180-185.
- MACEDO, A., MALCATA, F. X. AND OLIVEIRA, J. C. (1993). The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. Journal of Dairy Science, 76, 1725-1739.
- NUNEZ M., FERNANDEZ DEL POZO B., ASUUNCIA M.A., RODRIGUEZ M., GAYA P., MEDINA M., (1991). Effect of vegetable and animal rennet on chemical, microbiological, theological and sensory characteristics of La serena cheese. Journal Dairy Research, Vol.58, p.p.511-519.

- NUNEZ M, MEDINA M and GAYA P (1989). Ewe's milk cheese technology, microbiology and chemistry. Review article. *Journal of dairy research*, 56:303
- PAEZ DE LEON L., PINZON G. & OTAIZA VASQUEZ E. (1995). Purification and assay of chicken pepsin. *Acta Cient. Venez.*, 46 (4), pp. 237-241.
- RAMET J.P., (1997). Les agents de transformation du lait. In « Le fromage ». Paris, Ed. Tech. et Doc. Lavoisier (3e édition), p.p. 165-172.
- RENNER E., (1987). Nutritional aspect of cheese. *Milk in vital force*, *J. Dairy Sci.*, 43, 179-186.
- RAMEUF F., LENOIR J. et DUBY C., (1989). Etudes des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Le lait* 69. 499-518.
- SAMSON A., (2002). Cheesemaking from ultrafiltered milk using plant rennet. *The Australian journal of dairy technology*, vol.57, n.2, p.143.
- SIDRACH L., GARCIA-CANOVAS F., TUDELA J., NEPTUNO RODRIGUEZ-LOPEZ J., (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus*): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, vol. 66, p.p. 41-49.
- SOUSA et MALCATA., (1997). Comparative biochemical evolution during ripening of bovin, ovine and caprine cheese manufactured with extract of flowers of *Cynara Cardunculus* L. *Lebensmittelwissenschaft*, 97-103.
- STORRY J.E., GRANDISON A.S., MILLARD D., OWEN A.J., et FORD G.D., (1983) Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant., *J. Dairy Res.* 50. 215-229.
- SILVA S.V, BARROS R.M & MALCATA F.X.(2002). Hydrolysis of caseins by extracts of *Cynara cardunculus* precipitated by ammonium sulphate. *J. Food Sci.* 67, 1746–1751.
- VASSAL L., et GRIPON J.C., (1984). L'amertume des fromages à pâte molle de type Camembert : rôle de la présure de *Penicillium caseicolum*, moyens de la contrôler. *Le lait*, 64, 397-417.
- VEISSEYRE R., (1975). Technologie du lait. Récolte, traitement et transformation du lait, pays tempérés, pays chauds. La maison rustique, 3ème édition. Paris. 696.
- VIEIRA DE SA F., BARBOSA M., (1970). Activité coagulante comparée d'une présure végétale extraite du cardon (*Cynara cardunculus*) et de la présure animale. Congrès international de lait, Sydney, vol.1, p. 292.
- ANONYMOUS (2005). Statistiques du Ministère du commerce (Alger).
- BARBOSA M, CORRADINI C & BATTISTOTTI B. (1981). Cheesemaking experiments carried out on some Italian cheeses with vegetable rennet from Cardo (*Cynara cardunculus* L.). *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 32, 203–221
- BARBOSA M, VALLES E, VASSAL L & MOCQUOT G. (1976). L'utilisation d'extrait de *Cynara cardunculus* L. comme agent coagulant en fabrication de fromages à pâte molle et à pâte cuite. *Le Lait — Mémoires Originaux* 551, 1–17.
- BENCINI R. (2002). Factors affecting the clotting properties of sheep milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 705–719.

- BERRIDGE, N. J. (1952). An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *Journal of Dairy Research*, 9, 328–329.
- BRINGE N.A & KINSELLA, J.E.(1986). Influence of calcium chloride on the chymosin-initiated coagulation of casein micelles. *J. Dairy Res.* 53, 371–379.
- CAMPOS R, GUERRA R, AGUILAR M, VENTURA O & CAMACHO L. (1990). Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (*Cynara cardunculus*). *Food Chemistry*, 35, 89-97.
- CATTANEO T.M.P, NIGRO F, MESSINA G & GIANGIACOMO R. (1994). Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase. *Milchwissenschaft*, 49, 269–272.
- CHAZARRA S, SIDRACH L, LOPEZ-MOLINA D & RODRIGUEZ-LOPEZ J.N. (2007)- Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, (17) 1393–1400
- CHEN S, ZHAO J, & AGBOOLA S. (2008). Isolation and partial characterization of rennet-like proteases from Australian cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3127-3134.
- CHITIPINITYOL S, & CRABBE M.J.C. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, 61, 395–418.
- COLLIN J.C, GRAPPIN R & LEGRAET Y. (1977). Étude de la méthode de mesure, selon Berridge, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. *Rev. Lait. Franç.*, 355 , 389- 394.
- CORDEIRO M, JAKOB E, PUHAN Z, PAIS M.S & BRODELIUS P.E. (1992). Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus*—a comparison to chymosin. *Milchwissenschaft* 47 683–687.
- DAVIAU C, FAMELART M.H, PIERRE A, GOUDEDRANCHE H & MAUBOIS J. L. (2000). Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Lait*, 80, 397–415.
- DEHOVE R.A, (1990)- La réglementation des produits, qualité et répression des fraudes. Ed. Lamy, France , 13/550-13/560.
- EGITO A.S, GIRARDET J.M, LAGUNA L.E, POIRSON C, MOLLE D, MICLO L, HUMBERT G, & GAILLARD J.L. (2007). - Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. *International Dairy Journal* 17, 816–825
- FAHMI A.H. (1973). Studies of milk clotting enzymes from plant sources. II. Separation of milk clotting enzymes from *ficus carica* Var. Soltani. *Sudan journal of food science and technology*, 30-34.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA E, IMHOF M, SCHLICHTHERLE-CERNY H, BOSSET, J.O & NUÑEZ M. (2008). [Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with a *Cynara cardunculus* extract as coagulant](#) . *International Dairy Journal*, Volume18,Issue2,147-157
- FOX P.F, & MCSWEENEY P.L H. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*. UK: Blackie Academic & Professional.

- GARG S.K, & JOHRI B.N. (1994) . Rennet: current trends and future research. *Food Rev Int.*,10 , 313–55.
- GARNOT P. & MARTIN P. (1979). La présure, composition ,activité, son rôle en fromagerie. *La tech. Laitiere*, 930(3), 27-30.
- GENIN G. (1968). Les succédanés de la présure. *Le lait* (1-2), 55-58.
- GUNASEKARAN S, & AY C. (1996). Milk coagulation cut-time determination using ultrasonics. *Journal of Food Process Engineering*, 19, 63–73.
- HACINI N. (2007). Filière lait et risques alimentaires. *Magvet : Magasine de la production et de la santé animales*, 7ème Salon International de l'élevage et du machinisme agricole . 13-15 mai 2007, 22-29.
- HEIMGARTNER U, PIETRZAK M, GEERTSEN R, BRODELIUS P, DA SILVA FIGUEIREDO A.C & PAIS M.S.S.(1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteinases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry* 29, 1405–1410.
- HOUINS G, DEROANNE C et COPPEN R. (1973). Etude comparative de l'activité coagulante et du pouvoir protéolytique de la présure et de trios de ses succédanés. *Le lait*, 529-530, 610-611
- LAGAUDE A, FERNANDEZ L, CUQ J.L & MARCHESSEAU S.(2004). Characterization of curd formation during the rennet coagulation of milk by an optical microscopic method. *International Dairy Journal*, 14, 1033–1039.
- LAURENT J. (1974). Conservation des produits d'origines animales en pays chauds. Presses universitaires de France, 154p
- LO PIERO A.R, PETRONE G & PUGLISI I.(2002). Characterization of « lettuce », a serine_ like prottease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk-clotting. *Journal of Agriculture and Fodd Chemistry*, vol. 50, n. 8, 2439-2443.
- LOPES A, TEIXEIRA G, LIBERATO M.C, PAIS M.S & CLEMENTE A.(1998). New vegetal sources of milk clotting enzymes. *Journal of molecular catalysis B : Enzymatic*, vol. 83, p.181.
- LORENTE B.E, BRUTTI C.B, CAFFINI N.O.(2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agriculture and Fodd Chemistry*, Vol. 52, N. 26, 8182-8189.
- LOW Y.H, AGBOOLA S, ZHAO J, & LIM M.Y (2006). [Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk](#) . *International Dairy Journal*, Volume 16, Issue 4, 335-343
- MACEDO, A., MALCATA, F. X. AND OLIVEIRA, J. C. (1993). The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1725-1739.
- MARCOS A, ESTEBAN M.A, MARTINEZ E, ALCALA M & FERNANDEZ-SALGUERO J (1980) Inactivación térmica de las proteinasas del cardo *Cynara humilis* L.: constantes cinéticas y termidinámicas. *Archivos de Zootecnia* 29, 283–294.
- OKIGBO L.M, RICHARDSON G.H, BROWN R.J & ERNSTROMC.A.(1985). Interaction of calcium, pH, temperature and chymosin during milk coagulation. *J. Dairy Res.* 68, 3135–3142.

- ONER M.D & AKAR B. (1993). Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilisation in Gaziantep cheese production. *Lebensm. -Wiss. U. -Technol.*, 26, 318-321
- PAQUET D. (1977). Etude d'une protease acide produite par *Mucor meihei*. Thèse de Doctorat, Bioch., Univ. Nancy 1, France , 56-82.
- PARK H, YAMANAKA N, MIKKONEN A, KUSAKABE I. & KOBAYASHI H. (2000). Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 931–939.
- PAYNE F.A, HICKS C. L, MADANGOPAL S & SHEARER S.A. (1993). Fiber optic sensor for predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production. *Transactions of the ASAE*, 36, 841–847.
- PEREIRA C.L.I, GOMES E.O, GOMES A.M.P & MALCATA F. X (2008)- [Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture](#) . *Food Chemistry*, Volume 108, Issue3, 862-868.
- PICON A, GAYA P, MEDINA M & NUNEZ M. (1995). Kinetics of milk coagulation by mixtures of cyprosin and chymosin. *Milchwissenschaft*, 50, 393–395.
- POZNANSKI S., REPS A., AND DOWLASZEWICZ E. (1975). Propriétés coagulantes et protéolytiques de la protéase extraite de *Cirsium arvense*. *Le lait* (11), 669-682.
- QUEZEL P. & SANTA S. (1962). La flore Nouvelle de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris, Tome 1 et 2.
- RAPOSO S & DOMINGOS A. (2008). Purification and characterization milk-clotting. aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures . *Process Biochemistry* 43, 139–144
- RENNER, E., & ABD EL-SALAM, M. H. (1991). Application of ultrafiltration in the dairy industry. London, UK: Elsevier.
- RIFFAAT I.D, EL-SHIBINI S, ABD- SALAM M, & FAHIM A.H.(1970)- Studies on milk clotting enzymes from higher plants. *J.Dairy Sci.*, 23 (3), 151-154.
- SANNI A.I, ONILUDE A.A & MOMOH, M.O. (1999). Selection of starters and a starter-mediated novel procedure for production of wara, a West African soft cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 325–333.
- SGARBIERI V.C, GUPTE S.M, KRAMER D.E. AND WHITAKER J.R.I. (1964). Separation of the proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata* latices. *Journal of biological chemistry*, 239 (7), 2170-2177
- SIDRACH L, GARCIA-CANOVAS F, TUDELA J, & NEPTUNO RODRIGUEZ-LOPEZ J.(2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus*): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, vol. 66, 41-49.
- SILVA S.V & MALCATA, F.X. (1999). On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase, on ovine caseins. *Food Chemistry*, 67, 373–378.
- SILVA S.V, & MALCATA, F.X. (2000). Action of cardosin A from *Cynara humilis* on ovine and caprine caseinates. *Journal of Dairy Research*, 67, 449–457.
- SILVA S.V, BARROS R.M & MALCATA F.X.(2002). Hydrolysis of caseins by extracts of *Cynara cardunculus* precipitated by ammonium sulphate. *J. Food Sci.* 67, 1746–1751.

-
- SOUSA M.J & MALCATA, F.X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*, 82, 151–170.
- TEJADA L, ABELLÁN A, CAYUELA J, MARTÍNEZ-CACHA A, & FERNÁNDEZ-SALGUERO J. (2008)- [Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant](#) . *International Dairy Journal*, Volume 18, Issue 2,139-146
- TSOULI J.(1974). Etude comparée de l'activité de trois variétés d'artichauts du genre *Cynara scolymus* sur la coagulation du lait. *Le lait*, vol. 537, 415-421.
- UCHIKOBA T & KANEDA M.(1996). Milk clotting activity of cucumisin, a plant serine protease from Melon fruit. *Appl. Biochem. Biotechnol.*(56), 325-330.
- UMAR DAHOT, M., YAKOUB KHAN, M., & MEMON, A. N. (1990). Screening of some Pakistani plants for milk clotting activity. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 3, 284–286.
- VAN HOOYDONK, A.C.M & WALSTRA P. (1987). Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 41, 19–47.
- VERISSIMO P, ESTEVES C, FARO C & PIRES E. (1995). The vegetable rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters*, 17, 621–626.
- VERISSIMO P, RAMALHO-SANTOS M, FARO C, & PIRES E. (1998). A comparative study on the aspartic proteinases from different species of *Cynara*. *Aspartic Proteinases*, 436, 459–463
- WALSTRA P, GEURTS TJ, NOOMEN A, JELLEMA A, VAN BOEKEL MAJS. (1999). *Dairy technology: principles of milk properties and processes*. New York: Marcel Dekker Inc.;
- YOUSIF B.H, MCMAHON D.J & SHAMMET K.M. (1996). Milk clotting enzyme from *Solanum dobium* plant. *International Dairy Journal*, 6, 637–644.

ANNEXES

RESULTATS DE L'ANALYSE PROTEOMIQUE (CHULAVAL)

SEQUENCE DE PROTEINE : Traitement avec le logiciel Scaffold 2.0

P09177 (100%), 45 646,8 Da

CARP_RHIPU Mucorpepsin [Rhizomucor pusillus]

9 peptides uniques , 9 spectres uniques, 100 total spectra, 102/427 acides amines (24% de couverture)

MLFSKISSAILLTAASFALTSARPVSKQSDADDKLLALPLTSVNRKYSQTKHGQQAAEKLGGIKAFAL

PEPTIDES SIMILAIRES IDENTIFIES

FFDPSSSSTFK : 84% x 8

DSITVGGATVK : 86% 16

SRGGYFFWDAPVTGVK : 87%

AALPDATESQQGYTVPCSK : 95% x 12

TTFSLVLQK : 95%

SGSSSDTIDVSVPIISK : 95% x 42

MLLPVDK : 90% x 3

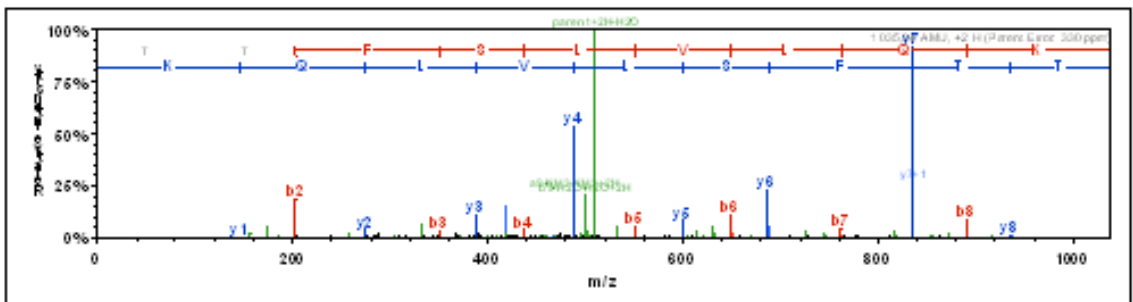
IGFAPLASGYENN : 95% x 2

Sequence Coverage	Protein	Category	Bio Sample	MS/MS Sa...	Prob	%Spec	#Pep	#Uniq	#Spec	%Cov	Weight
	CARP_RHIP...	Uncategoriz...	8782_DakuE...	Ingel8782.R...	100%	1,3%	9	9	100	24%	45 kDa

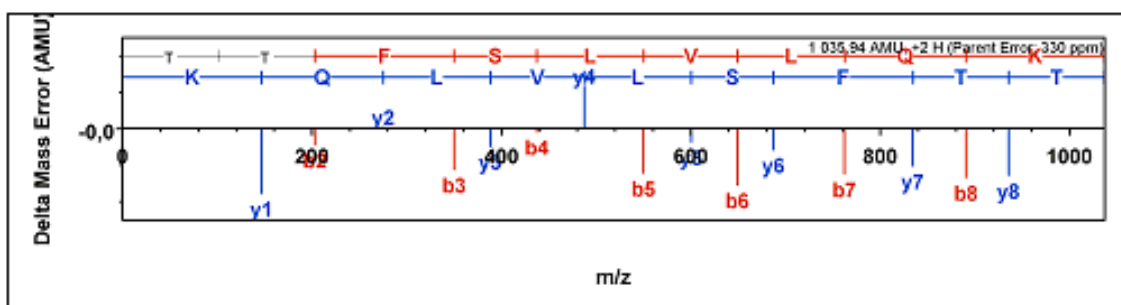
Proteines similaires :

Sequence Coverage	Protein	Accession	Prob	%Spec	#Pep	#Uniq	#Spec	%Cov	Weight
	CARP_RHIPU Mucorpepsin [Rhizomucor pusillus]	P09177	100%	2%	9	9	100	24%	45629
	Q9UQZ5_RHIPU MR-clothing aspartic proteinase ...	Q9UQZ5	100%	2%	9	9	100	24%	45685

Spectre SM :



Spectre SM :



Spectrum / Model Error

...	B Ions	B+2H	B-NH3	B-H2O	AA	Y Ions	Y+2H	Y-NH3	Y-H2O	...
1	102,1			84,0	T	1036,6	518,8	1019,6	1018,6	9
2	203,1			185,1	T	935,6	468,3	918,5	917,5	8
3	350,2			332,2	F	834,5	417,8	817,5	816,5	7
4	437,2			419,2	S	687,4	344,2	670,4	669,4	6
5	550,3			532,3	L	600,4		583,4		5
6	649,4	325,2		631,3	V	487,3		470,3		4
7	762,4	381,7		744,4	L	388,3		371,2		3
8	890,5	445,8	873,5	872,5	Q	275,2		258,1		2
9	1036,6	518,8	1019,6	1018,6	K	147,1		130,1		1

Table de Fragmentation

FICHE D'ANALYSE DES PROPRIETES SENSORIELLES

1. Fiche des termes utilisés pour décrire la texture

Définition

Synonymes ou adjectifs qui indiquent une différence d'intensité mais non de nature

Mou : par opposition à dur. Tendre

Dur : qui offre une résistance Ferme

à la mastication.

Souple : qui supporte sans se rompre Elastique, caoutchouteux, Compact

à une certaine déformation.

Friable : qui se désagrège sous l'effort Cassant

de mastication

Granuleux : qui présente des petits grains Farineux, sableux, grumeleux

plus ou moins durs.

Onctueux : homogène quant à la Moelleux, fondant, pateux, collant.

structure de la pâte.

Rêche : qui donne l'impression de présenter Rapeux, rugueux, sec, s'avale Etouffant. difficilement.

Glissant : par opposition à rêche, qui Fluide, gras, lisse.

s'avale facilement.

2. Echelle utilisée pour l'appréciation de la texture et du goût :

caractère absent (non reconnu)

caractère reconnu – intensité faible.

caractère reconnu – intensité moyenne.

caractère reconnu – intensité forte.

caractère reconnu – intensité très forte.

Fiche : Analyse de la texture

Nom :

Date :

1. Aspect

Caractère étudié 0 1 2 3 4

Mur 0 1 2 3 4

Plâtreux 0 1 2 3 4

Coulant 0 1 2 3 4

Croutage 0 1 2 3 4

2. Sensation dans la bouche

Deux adjectifs de sens opposés servent à décrire le même caractère.

Ceci a pour but de permettre une description complète des échantillons hétérogènes. Dans le cas où l'échantillon est homogène, il suffit de remplir la ligne correspondant à l'adjectif approprié, l'autre étant automatiquement noté 0.

Dureté/Mou 0 1 2 3 4

Dur 0 1 2 3 4

Cohésion/Souple 0 1 2 3 4

Friable 0 1 2 3 4

Structure de la pâte/Oncieux 0 1 2 3 4

Granuleux 0 1 2 3 4

Sensation sur la muqueuse/Glissant 0 1 2 3 4

Rêche 0 1 2 3 4