

***Étude comparative de deux protéases
coagulant le lait, extraites de pro
ventricules de poulet (*Gallus gallus*) et
d'estomacs de limon (*Seriola sp.*)***

Présenté par: Melle Hamrani Lamia

Directeur de thèse : M^r Bellal M.M. (Professeur : INA)
Co-directeur de thèse : Mr NOUANI A. (M.A. : Univ. Boumerdès)
2008/02/28

Jury Président : Mr AMMOUCHE A. (Professeur : INA) Examineurs : Mr MATI A. (M.C. : Univ. Tizi-
Ouzou) Mr YAKHLEF H. (M.C. : INA)

Table des matières

Remerciements . .	5
Liste des abréviations . .	6
Résumé . .	7
Abstract . .	8
ص غ ل م ل ا . .	9
INTRODUCTION . .	10
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE . .	12
I. LE LAIT : SUBSTRAT DES PROTEASES . .	12
1- Définition . .	12
2- Quelques caractéristiques physico-chimiques du lait . .	12
3- Composition chimique du lait . .	12
II. LES ENZYMES COAGULANT LE LAIT . .	16
1-Présure . .	18
2- les présures de remplacement . .	19
III. LES MECANISMES DE LA COAGULATION DU LAIT . .	28
1- La coagulation par acidification lactique . .	28
2- La coagulation par voie enzymatique . .	28
3 - la coagulation mixte . .	31
IV. LES FACTEURS DE LA COAGULATION ENZYMATIQUE DU LAIT . .	31
1 – Concentration en enzyme . .	31
2- Température . .	32
3- pH . .	32
4- Teneur en calcium . .	32
MATERIEL & METHODES . .	33
I. MATERIEL BIOLOGIQUE . .	33
1- Matières premières employées . .	33
2-Obtention et préparation des matières premières . .	33
II. EXTRACTION DE L'ENZYME . .	34
III. METHODES DE PURIFICATION . .	36
1- Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium . .	36
2 –Dialyse . .	38
3-Chromatographie par échange d'anions . .	39
4-Chromatographie par gel – filtration . .	39
5-Concentration avec le saccharose . .	40
6- Lyophilisation . .	40
IV. ETUDE DES EXTRAITS COAGULANTS BRUTS ET PURIFIES . .	40
1- Mesure de l'activité coagulante . .	40
2- Dosage des protéines totales . .	42
3- Mesure de l'activité protéolytique des extraits coagulants purifiés . .	42
V. CARACTERISATION DES EXTRAITS COAGULANTS PURIFIES . .	42

1- Détermination de la température optimale d'activité . . .	43
2- Influence de pH du lait . . .	43
3- Détermination de la concentration optimale de CaCl ₂ . . .	43
4- Influence de la concentration en extrait enzymatique . . .	43
5- Etude de la stabilité des extraits enzymatiques . . .	43
RESULTATS & DISCUSSION . . .	44
I. RESULTATS DES EXTRACTIONS . . .	44
1- Quantité de matière première récupérée . . .	44
2- Détermination de la méthode d'extraction . . .	44
II. PURIFICATION DES EXTRAITS COAGULANTS BRUTS . . .	45
1 – Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium . . .	45
2- Purification de l'extrait coagulant obtenu à partir de pro ventricule de poulet . . .	46
3- Purification de l'extrait coagulant obtenu à partir de l'estomac de limon . . .	48
III. CONCLUSION . . .	50
IV. Caractérisation des extraits coagulants purifiés et de la présure . . .	51
1- Activité coagulante comparée des extraits coagulants du poulet, de limon et de la présure en fonction de la température du lait. . .	51
2- Activité coagulante comparée des pepsines de poulet et limon et de la présure en fonction du pH du lait . . .	53
3- Activité coagulante comparée des pepsines du poulet, du limon et de la présure en fonction de la concentration du lait en CaCl ₂ . . .	54
4-Activité coagulante comparée des pepsines de poulet, limon et de la présure en fonction de la concentration en enzyme . . .	55
5 - Etude de la stabilité des extraits coagulants purifiés et de la présure . . .	56
6 - Activité protéolytique des extraits purifiés et de la présure . . .	59
V. CONCLUSION . . .	60
CONCLUSION GENERALE . . .	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES . . .	63
ANNEXES . . .	74
ANNEXE 01 . . .	74
ANNEXE 02 . . .	74
ANNEXE 03 . . .	75
ANNEXE 04 . . .	76

Remerciements

La mémoire est fidèle au moment de se souvenir des personnes qui ont rendu possible la réalisation et l'achèvement de ce travail, réalisé au laboratoire de recherches, département de technologie alimentaire et de la nutrition humaine, Institut National Agronomique d'Alger. Qu'il me soit permis d'exprimer toute ma reconnaissance à :

M^F Bellal M.M., Professeur à l'INA d'Alger et directeur de mémoire, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'acceptant au sein de son laboratoire, pour tout le temps et l'énergie qu'il m'a consacré afin de bien mener cette étude. Sa rigueur scientifique, ses suggestions ainsi que ses orientations m'ont énormément aidé lors de la réalisation de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et mon éternelle gratitude.

M^F Nouani A., Maître assistant et Chargé de cours à l'université M'Hamed Bougara de Boumerdés, pour sa présence, son soutien inconditionnel, son aide continue et ses conseils. Qu'il trouve ici le fruit d'un travail élaboré grâce à lui et qu'il soit rassuré de ma sincère estime et reconnaissance.

M^F Ammouche A., Professeur à l'INA d'Alger, pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider ce jury.

M^F Mati A., Maître de conférence à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'examiner ce modeste travail.

M^F Yakhlef H., Maître de conférence à l'INA d'Alger, pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'examiner ce modeste travail.

Mes vifs remerciements vont à M^F Mekimen L., Chargé de cours et Chef de département de technologie alimentaire et de la nutrition humaine à l'INA d'Alger, pour sa disponibilité et sa bienveillante attention qu'il m'a accordée tout au long de mon cursus universitaire.

Que M^R Sadouki H., Maître de conférence à l'INA d'Alger avec qui j'ai fait mes premiers pas dans l'enseignement supérieur, trouve l'expression de mon profond respect et remerciements pour sa grande compétence scientifique, ses valeurs morales dont j'ai énormément bénéficiées.

J'exprime toute ma reconnaissance aux personnels techniques et administratifs des départements de pédologie, zootechnie, phytotechnie et plus particulièrement ceux du département de technologie alimentaire et de la nutrition humaine, pour leur gentillesse, disponibilité, aide permanente, soutien moral et matériel.

Mes sincères remerciements vont à mes trois amies : Mme Boudah- Bellenteur K., M^{ELLE} Yahia N. et M^{elle} Akli S. ainsi qu'à tous mes collègues du laboratoire de botanique, faculté des sciences biologiques -USTHB d'Alger, pour leur soutien, leurs encouragements et surtout pour leur amitié.

Liste des abréviations

- pH max. pH maximum
- Temp. Opt. Température optimale
- K cal Kilo calorie
- Km Constante de Michaelis
- CaCl₂ Chlorure de calcium
- NaCl Chlorure de sodium
- °C Degrés Celsius
- °D Degrés Dornic
- % Pourcentage
- DODensité optique
- Da Daltons
- N normalité
- P/V Poids / volume
- g/l gramme/litre
- ml millilitre
- µg microgramme
- cm centimètre
- nm nanomètre
- M molaire
- mM milli molaire
- Tr tours
- pHi Point isoélectrique
- DEAE Di ethyl-amino ethyl
- UP Unité de présure
- Ve Volume d'éluion
- EEB Extrait enzymatique brut
- BSA Bovine sérum albumine
- LFB Laiterie Fromagerie de Boudouaou
- α, β, K, γ Alpha, Beta, kappa, Gamma

Résumé

Deux pepsines avicole et marine, coagulant le lait, ont été obtenues par macération de proventricules 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 : Pepsine ; Poulet (*Gallus gallus*) ; Limon (*Seriola sp.*) ; Coagulation ; Présure ; Lait.

Abstract

Comparative study of two milk-clotting proteases, extract of chicken proventricles (*Gallus gallus*) and yellowtail stomachs (*Seriola sp.*).

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 crud 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.

Key-words: Pepsin ; Chicken (*Gallus gallus*) ; Yellowtail (*Seriola sp.*) ; Milk-Clotting ; Rennet ; Milk.

ص خل مل ا

دراسة مقارنة لبروتينات مخثرين الحليب مستخلصين من بطين الدجاج (*Gallus gallus*)

و معدة الحوت (*Seriola sp.*)

ببسين الدجاج و الحوت ،مخثرين الحليب ، ذم نحصلها عن طريق مرس بطين الدجاج

(*Gallus gallus*) و معدة الحوت (*Seriola sp.*) هذين الأنتزيمين بميزان بقوة نخثر مقراها 1/3200 لببسن الدجاج و 1/545.45 لببسن الحوت .

عدة محاولات تنقية المستخلصين لمخثر الحليب ذم إنجازها . لوحظ أن المستخلص الخام المجفف لأحوت يقدم أفضل مردود (13.10%) من المستخلص الخام المجفف للدجاج (28.06%) بعد عملية تنقية

الظروف المثالية لعمل الأنتزيمية فد تم تحينها ، عمل الأنتزيمية تكون ذروته عند pH قدره 5 ، عدد درجة حرارة قدره ب 40م لببسن الدجاج و 45م لببسن الحوت و عدد تركيز $CaCl_2$ بقر ب 0.02 مول لببسن الدجاج و 0.04 مول لببسن الحوت ، المستخلصين الأنتزيميين بميزان بالاستقرار بين درجة حرارة 30م إلى 40م لمدة 30 دقيقة .

هذه الظروف متشابهة مع المروبات ماعدا تركيب $CaCl_2$ الحليب لببسن الحوت .

كلمات المفتاح :

ببسن دجاج (*Gallus gallus*)، سمك (*Seriola sp.*)، نخثر الحليب ، المروبات

INTRODUCTION

Le lait, par ses grandes qualités nutritionnelles, a toujours été considéré comme un produit noble. En effet, c'est un aliment indispensable dans les premiers mois de la vie et fondamental dans la vie de l'homme. Son instabilité biologique et physico-chimique constitue un facteur limitant de son utilisation en l'état. C'est dans ce contexte que sont apparues, il y a plusieurs millénaires les premières transformations fromagères.

Les fromages constituent une forme ancestrale de conservation des protéines, de la matière grasse ainsi que d'une partie du calcium et du phosphore, dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans presque toutes les régions du globe (Mahaut et *al.*, 2000).

La coagulation de lait est traditionnellement obtenue par action de la présure extraite industriellement des caillettes provenant de veaux non sevrés. La présure contient essentiellement une enzyme, la chymosine, dont la particularité est de posséder une activité protéolytique. Le caractère irrégulier de l'approvisionnement en présure qui s'est manifesté dans l'ensemble du monde a conduit les industries fromagères à substituer, parallèlement à l'usage traditionnel de la présure de veau, des préparations enzymatiques d'origine diverses, coagulant le lait de façon analogue à la présure animale.

Dans cette optique, un certain nombre d'enzymes (animale, microbienne ou végétale) ont été caractérisées. Il s'agit de protéases susceptibles d'attaquer les caséines du lait et plus particulièrement la caséine κ , dont la rupture d'une liaison peptidique particulièrement labile, la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆ provoque la coagulation du lait (Swaigood, 1982).

Les substituts de présures doivent répondre principalement à trois critères importants et qui consistent en :

- l'obtention de produits fromagers comparables à ceux de la présure animale ;
- l'absence de toxicité ;
- un prix de revient moins élevé à celui de la présure.

En Algérie, diverses études ont été réalisées sur les présures de remplacement. Il en ressort que les extraits coagulants d'origine végétale, tels que : la ficine (enzyme extraite du figuier) ainsi que la protéase de chardon (Morsli, 1997), la protéase d'artichaut (Mouzali, 2001) et celle des graines de melon (Fernani, 2003) étaient douées d'une très forte activité protéolytique, ce qui confère aux fromages des caractères organoleptiques indésirables.

La protéase issue de la culture d'une souche bactérienne, isolée localement à partir de *Bacillus subtilis* LC₃₃ (Matoub, 2000) a montré une activité coagulante analogue à celle de la présure traditionnelle et une activité protéolytique assez élevée, ce qui limite son utilisation dans l'industrie. Une protéase d'origine fongique, extraite partir de la culture de *Mucor pusillus* a montré des résultats similaires à celle de la présure commerciale (Belhamiche, 2005). Les études rapportées sur la pepsine avicole, bovine, ovine et celle de poisson, respectivement par Morsli, 1997 ; Bengana, 2000 ; Slamani, 2004 et Maachou, 2004 ont montré que ces agents coagulants présentaient des propriétés qui sont presque analogues à celle de la présure traditionnelle. Cependant, la disponibilité des matières premières d'origine animale reste tributaire du marché de la viande.

La production d'enzymes coagulants le lait à partir de pro ventricules de poulet et d'estomacs de limon présente un intérêt industriel. En effet, elle constitue l'une des voies de la valorisation des coproduits d'abattage avicole et marine. L'objectif principal de notre recherche consiste en une étude comparative de deux extraits coagulants, obtenus à partir de proventricules de poulet (*Gallus gallus*) et d'estomacs de limon (*Seriola sp.*). Pour cela, nous nous sommes orientés vers :

- -L'obtention et purification de la pepsine avicole et marine.
- La recherche des conditions optimales d'activité coagulante des deux pepsines purifiées et celle de la présure animale.
- La caractérisation de l'activité protéolytique des extraits coagulants bruts et purifiés par comparaison à la présure commerciale.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE LAIT : SUBSTRAT DES PROTEASES

1- Définition

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le congrès international de la répression des fraudes : « Le lait est le produit intégrale de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (Luquet, 1985).

Le lait est sécrété par les glandes mammaires des femelles de mammifères. Il est convenu de réserver le mot « lait », sans spécification, à la sécrétion lactée de la vache. Dans tout les autres cas, on le fait suivre de la désignation de l'espèce : lait humain, lait de brebis, lait de chèvre, etc.

2- Quelques caractéristiques physico-chimiques du lait

2.1 – Aspect

Le lait de vache est un liquide opaque de couleur blanche, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β -carotène de sa matière grasse. Sa saveur est douce et son odeur faible, mais identifiable. Le pH est voisin de la neutralité.

2.2- constantes physiques

Les principales constantes physiques du lait sont reprises au tableau 1.

3- Composition chimique du lait

Les laits sécrétés par les différentes espèces de mammifères présentent des caractéristiques communes et contiennent les mêmes catégories de composant : eau, protéines, lactose, matières grasses et minérales (CEPIL, 1987). Cependant, les proportions respectives de ces composantes varient largement selon : l'espèce, la race, le stade de lactation, la saison, l'état sanitaire, l'alimentation, etc. (Mietton, 1991).

Le tableau 2 donne la composition moyenne du lait de quelques espèces. Ce sont les laits de vache, de chèvre et de chamelle qui présentent des compositions les plus équilibrées en lipides, lactose et protéines. Les laits sont riches en matériaux plastiques (protéine, sels minéraux) dans les espèces à croissance néo-natale rapide (renne, truite) ; en matériaux énergétiques (matières grasses) chez les animaux marins vivants en climat froid (baleine bleue, otarie, renne) ; en lactose dans les espèces à développement cérébral important (femme, jument). Les laits riches en caséines (vache, brebis, chèvre et chamelle) coagulent par acidification ou par action enzymatique (fabrication de fromage).

Constantes	Moyennes	Valeurs extrêmes
- Densité à 20°C :		
Lait entier	1,032	1,028 – 1,034
Lait écrémé	/	1,035 – 1,036
Matière grasse	/	0,94 - 0,96
- Viscosité à 20°C (P.a.s)		
Lait entier	2,2. 10 ⁻³	/
Lait écrémé	1,9. 10 ⁻³	/
- Point de congélation (°C)	- 0,555	/
- Point d'ébullition (°C)	/	100,15 – 100,17
- pH à 20°C	/	6,6 - 6,8
- Acidité titrable (°D)	/	15 - 18

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques du lait de vache
(Mahaut et al., 2000).

		Matière sèche	Matière grasse	Protéines	Caséines % de II total	Lactose	Cendre
Lait humain		12,6	3,75	1,6	28	7	0,21
Ruminants	Vache	12,5	4,1	3,6	78	5	0,71
	Chèvre	13	4,2	3,5	75	4,3	0,86
	Brebis	19,3	7,9	5,2	77	4,8	0,9
	Bufflesse	17,9	8	4,2	80	4,9	0,78
	Renne	36,7	22,5	10,3	80	2,5	1,44
	Chamelle	13,6	4,5	3,5	28	5	
Equidés	Jument	11	1,6	2,7	50	6,1	0,51
	Anesse	11	2,5	2	45	6,1	
Suidés	Truie	18,3	6	6	50	5,4	0,9
Mammifères marins	Baleine bleue	55	42,3	10,9	66	1,3	
	Otarie	62,3	53,3	8,9	52	0,1	

Tableau 2 : Composition moyenne des laits de différentes espèces animales % en poids

(Mahaut et al., 2000).

Le tableau 3 donne la composition moyenne des éléments majeurs du lait de vache de race laitière. Le lait est donc un liquide très aqueux dont la composition pondérale en glucides, lipides et protides est remarquablement équilibrée (respectivement 1,5, 1,0, 1,0) (Alais et Linden, 1997). Parallèlement moins importants, d'autres constituants ont un rôle biologique fondamental : Ce sont des matières azotées non protéiques, des vitamines, des enzymes, des pigments et des gaz dissous.

Étude comparative de deux protéases coagulant le lait, extraites de pro ventricules de poulet (*Gallus gallus*) et d'estomacs de limon (*Seriola sp.*)

Le lait est donc un mélange d'une très grande complexité, constitué à 90% d'eau et qui comprend :

- une solution vraie : lactose, protéines solubles, minéraux, vitamines hydrosolubles.
- une solution colloïdale : protéines, en particulier les caséines.
- une émulsion : matières grasses.

	Composition (g / l)	Etat physique des composants
Eau	905	Eau libre (solvant) + eau liée
Glucides : Lactose	49	Solution
Lipides :	35	Emulsion des globules gras (3 à 5 microns)
-Matière grasse proprement dite	34	
-Lécithine (Phospholipides)	0,5	
-Partie insaponifiable (Stérols, Carotènes, Tocophérols)	0,5	
Protides :	34	
-Caséine	27	Suspension micellaire phosphocaséinate de calcium (0,08 à 0,12 microns)
-Protéines « solubles » (globulines, albumines)	5,5	Solution (colloïdale)
- Substances azotées non protéiques	1,5	Solution (vraie)
Sels :	9	Solution ou état colloïdal
-Acide citrique	2	
-Acide phosphorique	2,6	
- Acide chlorhydrique	1,7	
Constituants divers :	Traces	
Vitamines, enzymes, gazs dissous		
Extrait sec total :	127	
Extrait sec non gras	92	

Tableau 3 : Composition moyenne d'un litre de lait de vache (g / l)

(Alais et Linden, 1997).

3.1- Les matières azotées

Les matières azotées, protides ou protéines du lait constituent un ensemble complexe (Withney et al., 1976 ; Mietton et al., 1994) dont la teneur totale avoisine 35 g/l (tableau 4).

Les protéines représentent 95 % environ des matières azotées et c'est sur la base de la précipitation à pH 4,6 (à 20°C) qu'on sépare deux constituants : les caséines (α_s , β , γ et κ) et les protéines solubles du lactosérum (Dagleish, 1982 ; Mietton et al., 1994). Les caséines représentent la fraction protéique la plus importante. Elles jouent un rôle déterminant dans le processus de la coagulation du lait, c'est elles qui forment la structure même des fromages.

Le lait de vache contient une fraction azotées non protéique (environ 5%). Il s'agit de nombreuses substances à faible masse moléculaire (urée, créatine, créatinine,

ammoniaque) ; à côté, il y'a des intermédiaires métaboliques (acide orotique) et des acides aminés libres. Cette fraction est peu importante (Mietton et al., 1994 ; Alais et Linden, 1997).

	Moyennes relatives (%)	Moyennes absolues (g / litre)
Matières azotées totales : protides totaux	100	34,0
A- Protéines :	95	32,3
- Protéines non solubles (caséine entière)	78 100	26,5
* caséine α_1	36	09,55
* caséine α_2	10	02,65
* caséine β	34	09,00
* caséine κ	13	03,45
* caséine γ	07	01,85
- Protéines solubles (protéines du lactosérum)	17 100	5,8
* β lactoglobuline	50	2,9
* α lactalbumine	22	1,3
* sérum albumine	05	0,3
* Immunoglobulines	12	0,7
* Protéases peptones	10	0,6
B- Substances azotées non protéiques	05	1,7

Tableau 4 : Composition moyenne et distribution des protéines du lait de vache (Alais et Linden, 1997).

3.1.1- Les caséines

La caséine entière (groupe protéique qui précipite à pH 4,6 à 20°C) représente environ 80 % des protéines totales du lait de vache.

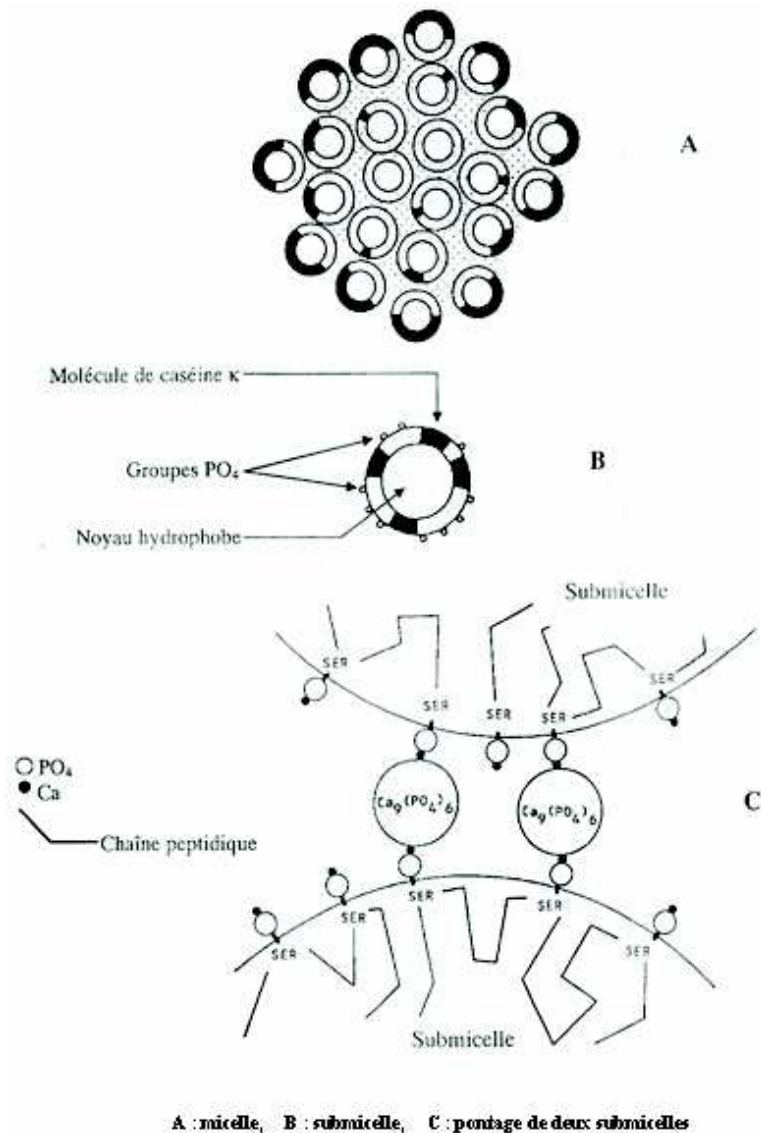
Les caséines sont des polypeptides phosphorés associés surtout à des constituants minéraux , en particulier le calcium , mais aussi le phosphate , le magnésium et le citrate , de manière à former des micelles de phosphocaséinate de calcium .

En mélange, elles constituent entre elles des complexes qui ne réunissent en l'absence de calcium qu'un petit nombre de molécules. En présence de calcium , le degré d'association est très élevé et les unités formées agrègent plusieurs milliers de molécules , constituants les micelles de caséine native dispersées dans la phase hydrique du lait .

Une des plus importantes propriétés des micelles de caséine est de se déstabiliser par hydrolyse enzymatique et de permettre ainsi la coagulation du lait, ce qui est le fondement de la fromagerie (Mietton et al. ,1994).

Selon Schmidt (1980), la micelle serait constituée d'un ensemble de sous unités, les submicelles, de nature exclusivement protéique et de composition variable, associées les unes aux autres par des éléments minéraux (phosphate de calcium et de magnésium). les

submicelles auraient un cœur hydrophobe, formé par des parties apolaires de caséines et une enveloppe hydrophile de nature polaire, formée de segments de chaînes hautement chargées avec, d'autre part, les résidus phosphoséryls des caséines α_{S1} , α_{S2} et β et, d'autre part, la partie COOH terminale de la caséine κ (Mietton et al., 1994). Ces submicelles sont organisées de telle manière que les pôles hydrophobes soient à l'intermédiaire du calcium et du phosphate minéral (figure 1). La caséine κ , localisée à l'intérieur de la micelle, joue un rôle protecteur grâce à sa faible teneur en phosphore et à sa richesse en glucides. Elle est hydrophile et assure la stabilité de la micelle (Gourseaud, 1993).



A : micelle, B : submicelle, C : pontage de deux submicelles

Figure 1 : Modèle de formation des micelles selon Schmidt (1980) (Ramet, 1990).

II. LES ENZYMES COAGULANT LE LAIT

Les protéases constituent le groupe le plus important des enzymes industrielles dans le monde et possèdent plusieurs applications dans le domaine de l'industrie alimentaire (Garcia- carreno, 1991). Plusieurs sources sont utilisées pour la production de ces enzymes commerciales (Chaplin et Bucke, 1990).

La coagulation du lait est l'étape fondamentale de la fabrication des fromages. Divers enzymes protéolytiques ont la propriété de coaguler le lait (Tableau 5) : elles sont soit d'origine animale (présure, pepsine) ; soit d'origine végétale (ficine, bromélaïne, enzymes extraites de l'artichaut, de la courge, du chardon, etc.) ; soit d'origine microbienne (enzyme de certaines moisissures ou de bactéries) (Mahautet *al.*, 2000).

	Origines	Enzymes
Animaux	Ruminants :	
	Veau *	Chymosine + pepsine
	Chevreau * -----	
	Agneau *	Pepsine + chymosine
Bovins adultes * -----		
	Mono gastriques :	
	Porcs -----	Pepsine
	Oiseaux :	
	Poulet -----	Pepsine
Végétaux	Figuer	Ficine
	Ananas	Bromélaïne
	Chardon, Artichaut	
	Gaillet	
	Courge	
Moisissures	<i>Endothia parasitica</i> *	Protéase
	<i>Mucor pusillus</i> *	Protéase
	<i>Mucor miehei</i> *	Protéase
	<i>Aspergillus niger</i>	Chymosine « génétique »
Levures	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Chymosine « génétique »
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	Chymosine « génétique »
	<i>Bacillus subtilis</i>	Chymosine « génétique »

* Autorisé en France.

Tableau 5 : Origine des différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait (Mietton, 1991).

Toutes les enzymes coagulantes de fromagerie sont des protéases à caractère acide dont l'activité optimale est généralement proche de pH 5,5 (Ramet, 1993). Ces protéases acides présentent comme la présure un centre catalytique à résidu aspartyle (Eck, 1990) et appartiennent au même groupe des aspartates protéinases (Alais et Linden, 1997).

Les enzymes coagulantes sont capables d'hydrolyser très spécifiquement la caséine κ à des pH compris entre 6-6,5 (Queiroz-Macedo et *al.*, 1993). La plus couramment utilisée est la présure sécrétée par la caillette des jeunes ruminants non sevrés. Les présures de remplacement sont moins coûteuses mais très protéolytiques et conduisent à des fromages présentant de l'amertume avec diminution du rendement (Desmazeaud, 1981).

Actuellement, les méthodes du génie génétique ont permis de cloner le gène de la chymosine sur certains micro-organismes (*Escherichia coli*, *kluyveromyces*, *Aspergillus*, etc.) (Alais et Linden, 1997 ; Mahaut et al., 2000).

1-Présure

1.1- Origine et dénomination

La présure est une enzyme qui se produit en jus gastrique. C'est l'agent de caillage le plus commun qui provient généralement de sources animales, spécifiquement de la doublure des estomacs de met bas mais aussi par la culture de certains micro-organismes.

La dénomination de « présure » est réservée à l'extrait soit liquide, soit pâteux, soit pulvérisé ou comprimé après dessiccation, provenant de la macération des caillettes de jeunes bovidés tenus exclusivement au régime du lait (Moll et Moll, 1998). On parle ainsi de présure de veau, de présure d'agneau, de présure de chevreau (Desmazeaud, 1981).

La présure de veau est la préparation coagulante traditionnellement utilisée pour la coagulation du lait en vue de la fabrication de la majorité des fromages (Alais, 1984 ; Wigley, 1996), de petites quantités sont produites à partir de l'estomacs de chevreau et d'agneau (Ramet, 1985).

D'un point de vue biochimique, la présure est une enzyme protéolytique appartenant au groupe des endopeptidases ayant la faculté d'hydrolyser les protéines au milieu de la chaîne. C'est une substance organique qui renferme un mélange de deux fractions actives : la chymosine et la pepsine, avec une prédominance de la chymosine (Lenoir et al., 1985 ; Eck, 1990 ; Brulé et al., 1997). Ces deux enzymes proviennent d'un zymogène inactif « pro présure » (Eck et Gillis, 1997) qui acquiert l'activité à la suite d'une hydrolyse partielle dans le milieu acide stomacal (Alais, 1984 ; Lenoir et al., 1985). Au cours de l'activation, des peptides riches en tyrosine formant la partie N-terminale sont détachés. Ceci conduit à une baisse de pH isoélectrique de pHi 5,0 (pro présure) à pHi 4,7 (présure) (Veisseyre, 1978 ; Collin, 1981).

Le rapport chymosine / pepsine a une importance sur la vitesse de coagulation et sur les caractères rhéologiques du gel (Mietton et al., 1994). Selon la législation Française, le rapport chymosine/pepsine doit être supérieur ou égal à 1,38, ce qui signifie que 75 à 80% de l'activité coagulante est due à la chymosine (Mahaut et al., 2000).

1.2- Propriétés et mode d'action

La chymosine, extraite de la présure de veau ou obtenue par voie microbienne, est la véritable enzyme de coagulation du lait. C'est une holoprotéine, sécrétée sous forme de pro enzyme inactive appelée « pro-chymosine ». L'activation de la pro enzyme en chymosine se fait, spontanément, dans la caquette aux pH inférieurs à 5 par l'hydrolyse de l'extrémité NH₂ terminale de la molécule. Son poids moléculaire est de 30 700 daltons. Sa stabilité est maximale entre pH 5,0 et pH 6,0 avec un pH optimal d'activité proche de 5,5 et une température optimale d'activité de 42°C. L'activité décroît rapidement ; elle est affaiblie à température ambiante (20-35°C) et est inhibée à pH 8,0 et au voisinage de 0°C et vers 65°C (Mahaut et al., 2000 ; Eck et Gillis, 1997).

En tant qu'enzyme protéolytique, la chymosine a une double action coagulante par hydrolyse de la caséine κ d'une part, une action protéolytique générale capable de se manifester sur toutes les protéines au cours de l'affinage du fromage d'autre part (Desmazeaud, 1985 ; Eck, 1990 ; Mahaut et al., 2000).

1.3- Extraction de la présure de veau

Industriellement, la présure est extraite par macération de fragments de caillettes de jeunes bovidés dans une solution de chlorure de sodium pendant quelques jours. L'extraction a lieu à un pH voisin de 6,0. Le pH étant ajusté entre 5,0 et 5,5 pour favoriser l'activation de la pro chymosine.

Le jus de macération est ensuite clarifié à l'alun puis filtré. La standardisation de la force, du pH, de la teneur en CaCl_2 , de la couleur est effectuée finalement parallèlement à l'ajout de conservateurs autorisés par la réglementation. Conservés à températures ambiantes, les extraits liquides perdent lentement leur activité, ils doivent être conservés au froid (0-5°C). Il existe également des présures sèches (poudre ou comprimés), mieux adaptées à la conservation mais moins pratiques à l'emploi, elles sont obtenues par relargage au sel d'extraits liquides (Ramet, 1985 ; Dehove, 1990 ; Eck, 1990).

2- les présures de remplacement

La chymosine est l'agent de coagulation le plus utilisé par les industries laitières. Pourtant, depuis quelques années, face à l'augmentation systématique du prix de la chymosine, de nouveaux substituts ont été sélectionnés (Queiroz-Macedo et al., 1993).

Les enzymes de remplacement, qui sont moins onéreuses et assez utilisées dans certains pays où les caillettes sont rares, sont capables de scinder la liaison phénylalanine-méthionine si labile de la caséine kappa et, comme la présure, de provoquer la coagulation du lait (Desmazeaud, 1981 ; Alais et Linden, 1997).

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

2.1- Les protéases d'origine animale

L'amélioration des techniques de purification a permis de mettre en évidence au moins deux grands groupes de protéases aspartiques d'origine gastrique : le groupe majeur est appelé pepsinogène et le groupe mineur gastricine. Les pepsinogènes et gastricines diffèrent par leurs caractéristiques enzymatiques et physico-chimiques (Banga-Mboko et al., 2002).

Les pepsinogènes sont des pro enzymes inactives (zymogènes) des pepsines. Ces molécules synthétisées essentiellement au niveau de la muqueuse gastrique, appartiennent à la classe des protéases aspartiques d'origine gastrique ; leur masse moléculaire est de 43 000 et 35 000 daltons, respectivement pour les pepsinogènes et les pepsines (Takahashi et Kageyama, 1985 ; Richter et al., 1998 ; Banga-Mboko et al., 2002).

On dénombre plusieurs formes de pepsinogènes différenciables biochimiquement (Foltmann et al., 1992). Cinq pepsinogènes différents ont été dénombrés (Tableau 6) et qui pourraient représenter que des formes intermédiaires d'activation d'une seule pepsine (Larbier et Leclercq, 1992). Il s'agit de : pepsinogène A, B et F, progastricine et prochymosine (Kageyama, 2002).

Les protéases gastriques aspartiques étaient déjà connues depuis l'antiquité pour leurs actions protéolytiques. Ainsi la chymosine était utilisée depuis des millénaires dans la

fabrication des fromages à partir du lait. Théodore Schumann, en 1836, attribua le nom de « pepsine » au ferment responsable de l'activité protéolytique du suc gastrique. Ce ferment se distingue des autres enzymes du tractus digestif par son pouvoir de digestion des protéines en milieu acide. Heidenheim, en 1870, attribua pour la première fois la sécrétion de pepsinogène aux cellules principales de la muqueuse gastrique. Hammarsten, en 1872, démontra que la chymosine est synthétisée et stockée par l'acide stomacale ; Langley, en 1882, fit la même observation sur la pepsine porcine (Banga-Mboko et al., 2002).

En 1929, Northrop parvint à obtenir la pepsine sous forme cristallisée à partir d'extraits de muqueuse gastrique bovine (Moll et Moll, 1998). Quelques années plus tard, Herriot, en 1938, entreprit la même démarche sur la pepsine porcine. 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).

Tableau 6 : Classification des pepsinogènes

Zymogènes (pro enzymes)	Enzymes	Nomenclature	Références
Pepsinogène A	Pepsine A	EC 3.4.23.1	Ryle (1970) Foltmann (1981) Ichihara et al. (1985) Foltmann et al. (1992) Kageyama et al. (2000)
Pepsinogène B	Pepsine B	EC 3.4.23.2	Ryle (1970) Nielsen et Foltmann (1995)
Pro gastricine	Gastricine ou Pepsine C	EC 3.4.23.3	Foltmann (1981) Kageyama et al. (2000)
Pro chymosine	chymosine	EC 3.4.23.4	Foltmann (1970) Foltmann (1981) Kageyama et al. (2000)
Pepsinogène F	Pepsine F	-	Foltmann (1981) Kageyama et al. (2000)

La pepsine est une endopeptidase qui scinde les protéines alimentaires au niveau des acides aminés aromatiques (Tyrosine, Phénylalanine, Tryptophane) en libérant la fonction amine engagée dans une liaison peptidique. Les protéines sont ainsi transformées en peptones solubles dans l'estomac (Moll et Moll, 1998).

Elle a une activité optimale (pH 1,8) pour un niveau d'acidité élevée (pH compris entre 1 et 4). Elle est donc parfaitement adaptée à l'environnement acide de l'estomac (Sielecki et al., 1990 ; Andreeva et James, 1991 ; Cuvellier, 1993). Son point isoélectrique est inférieur à 1 et son pH de stabilité est compris entre 5 et 5,5. La pepsine est détruite par les basses ou par les températures supérieures à 70 °C (Kopelman et Cogan, 1983).

Par convention, les protéases acides isolées dans l'estomac à pH faible sont appelées pepsines tandis que, celles localisées dans d'autres tissus à pH plus élevé sont appelées cathepsines (Banga-Mboko et al., 2002).

Une des caractéristiques communes à toutes les pepsines est d'être plus actives en milieu acide que la présure et chymosine. La pepsine possède une activité protéolytique non négligeable qui peut se manifester dans les fromages par la libération de peptides amers ; l'accident dépend de la quantité d'enzyme coagulante résiduelle retenue dans le fromage.

L'activité coagulante décroît fortement au dessus de pH 6,3 ; au pH du lait frais (6,65-6,75), la coagulation n'apparaît pas (Ramet, 1993).

Plusieurs protéases d'origines animales ont fait l'objet d'expérimentation en vue d'une utilisation potentielle en industrie fromagère. Le tableau 7 rapporte quelques propriétés comparées de trois pepsines d'origine animale.

Tableau 7 : Propriétés comparées de la pepsine de poisson avec celle des mammifères

Propriétés	Poisson	Bovine	Porcine
pH optimum (a)	2-3,5	2,0	1,8-2,0
pH max. de coagulation	6,4-6,6	6,8	6,4-6,6
Temp. opt. de protéolyse (b)	30-35°C	38°C	47°C
Temp. opt. de coagulation	30°C	30-50°C	30-50°C
Inactivation thermique	30-37°C	-	50°C
Point isoélectrique	3,5-7,5	-	2,7
Energie d'activation (K cal / mole) (b)	4-8	-	11,2
Km (b)	0,4 mM	0,34 mM	0,037 mM
Poids moléculaire (c)	36-38 000	34 000	34 000
CaCl ₂ opt. de coagulation	,04 mM	,03-,05 mM	,03-,05mM

(Haard et al., 1982).

(a) Hémoglobine comme substrat.

(b) pH 2,0 avec Hémoglobine comme substrat.

(c) déterminé par électrophorèse sur gel Page-SDS.

· La pepsine bovine

La pepsine bovine représente un des constituants mineurs normaux de la présure. Elle est secrétée par la cailllette en quantité importante après sevrage des bovidés, c'est pour cette raison que la présure a toujours été extraite de jeunes ruminants avant sevrage (Berankova et al., 1987 ; Ramet, 1987) .

Fox (1969) signalait que la pepsine bovine coagulait le lait jusqu'à pH 6,9. Cependant, elle donnait naissance à des différences dans la texture et la saveur (Emmons et al., 1976 ; Stanley et Emmons, 1977).

Depuis quelques années, des préparations de pepsine bovine (extraits coagulants obtenus à partir de caillettes de bovins adultes) ont été testées en fromagerie dans différents pays. Garnot et al., 1972, montraient que la chymosine et la pepsine bovine étaient présents ensemble dans les préparations de présure. En effet, selon Valles et al., (1977), les fromages étaient fabriqués, depuis toujours, avec un mélange de chymosine et de pepsine bovine où la pepsine entrait dans une proportion non négligeable.

Selon Anifantakis et Kandarakis (1983), la pepsine bovine peut substituer, avec succès, la présure habituelle dans la fabrication du fromage « Feta ».

En Algérie, Les abats de bovins adultes ont été utilisés comme source potentielle de coagulases par Bengana (2001). Ce dernier a obtenu un extrait brut contenant deux protéases ; il s'agit de la pepsine (fraction majeure) et la chymosine (fraction mineure). La pepsine bovine a permis avec succès la fabrication de fromage à pâte molle « Camembert ».

- La pepsine de porc

La pepsine a été extraite de la muqueuse gastrique de porc où elle se trouve sous la forme d'un précurseur, le pepsinogène, d'un poids moléculaire de 42 000 daltons (Cuvellier, 1993). Cette protéase aspartique est instable aux pH neutres, où elle est rapidement inactivée (Tanaka et Yada, 2001).

Selon Desmazeaud (1981), la pepsine du porc est difficilement utilisable en fromagerie puis ce qu'elle ne coagule pas le lait frais à pH supérieurs à 6,6. La protéolyse est plus lente au cours de l'affinage et des goûts amers apparaissent.

Green (1972) avait signalait que des fromages fabriqués avec des extraits coagulants à base de pepsine de porc et de pepsine bovine étaient peu différents de ceux fabriqués avec une présure de présure.

En 1973, Phelan concluait de ses essais, que la fabrication de Cheddar à l'aide d'une présure de pepsine bovine ou d'un mélange de présures de pepsine bovine et de pepsine de porc était satisfaisante.

Aux Etats-Unis, la pepsine de porc est largement utilisée sous forme de mélange 50-50 avec la présure (Cerning et al., 1984 ;Eck, 1990).

- La pepsine d'ovin

Seules les pepsines de porc et d'ovin présentent un intérêt industriel. En effet, la pepsine d'ovin apparaît être voisine de la présure et son activité est dépendante du pH que celle de la pepsine de porc(Eck ,1990).

Les caillettes d'ovins ont été utilisées comme source potentielle de remplacement de la présure. L'extrait enzymatique brut obtenu par Slamani (2004) a montré qu'il coagulait assez bien le lait et n'avait pas d'influence néfaste en fromagerie lors de la fabrication du fromage « Edam », réalisée par Outaleb (2006).

- La pepsine de poulet

En 1969, Bohak a isolé le pepsinogène et la pepsine à partir des estomacs frais de poulet. Après purification et caractérisation, l'auteur a noté que le pepsinogène de poulet était stable à 24°C , en dessous de pH 10,5 , par contre la pepsine de poulet était stable à pH inférieur à 8 . A pH 8.5 et au dessus, la pepsine de poulet est rapidement inactivée. Cette inactivation à 40 °C et à pH 8,5 est accompagnée par une autolyse.

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 .

Scott(1979) rapportait qu'en1973 – 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.

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

La pepsine de poisson

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).

Récemment un grand nombre d'enzymes ont été isolées, telles que phosphatase alcaline, acetylglucosaminidase, chitinase et protéases (Venugopal ,1995). Les protéases issues de zymogènes (gastriques et pancréatiques) sont listées dans le tableau 8. Elles sont représentées par une protéase aspartique, la pepsine, et quatre protéases sérine : trypsine, chymotrypsine, collagénase et élastase (Gildberg, 1988 ; Martinez et Serra, 1989). Ces protéases sont chacune actives sur des liaisons peptidiques bien définies et différentes (Guillaume, 1999). Le tableau 9 représente le site d'action des principales enzymes digestives protéolytiques des poissons.

	Enzyme	Activité	Organe	Espèce
Protéases	Pepsine (*)	Hydrolyse des liaisons internes	Estomac	Espèces à estomac
	Trypsine	//	Pancréas	Toutes espèces
	Chymotrypsine	//	Pancréas	Toutes espèces
	Elastase	//	Pancréas	Toutes espèces
	Collagénase	//	Pancréas	Toutes espèces

Tableau 8 : Les protéases sécrétées sous forme de pro enzymes chez les poissons (Guillaume, 1999).

(*) Une chymosine a été signalée chez plusieurs espèces, il s'agit d'une iso enzyme de la pepsine ayant une activité coagulante vis-à-vis du lait.

Enzyme	Liaison hydrolysée
Pepsine	NH ₂ des acides aminés aromatiques et diacides
Trypsine	COOH de l'arginine ou de la lysine
Chymotrypsine	COOH des acides aminés aromatiques
Elastase	Acides aminés aliphatiques (spécialement actives sur élastine).
Carloxyptidases	Acides aminés dont COOH libre
Aminopectidases	Acides aminés dont NH ₂ libre
Di et tri-peptidases	Liaisons des di et tri-peptidases.

Tableau 9 : Site d'action des principales enzymes digestives protéolytiques des poissons

(Guillaume, 1999) .

Les protéases acides des estomacs de poisson manifestent une activité élevée entre pH 2 et pH 4 tandis que les protéases digestives alcalines sont plus actives entre pH 8 et pH 10 (Simpson, 2000) .

L'étude sur l'activité protéolytique des enzymes présentes dans les viscères de poissons a débuté dans le 19^è 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).

L'équipement en enzymes digestives n'est pas le même chez toutes les espèces. Par exemple, la pepsine est toujours absente chez les poissons dépourvus d'estomac. Le pH optimal de la pepsine se situe aux alentours de 2-3, pour toutes les autres enzymes (pancréatiques), il se situe aux alentours de 7-8. La température optimale d'activité de presque toutes les enzymes de poissons (et pas seulement des enzymes digestives) se situe entre 30-40 °C (Guillaume ,1999).

Une pepsine a été obtenue depuis de nombreuses années à partir de la muqueuse gastrique d'un Saumon du Pacifique. Une enzyme ayant une activité voisine de la présure a été décrite chez la truite (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 à 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 : sardine (Noda et Murakami, 1981), Capelin (Gildberg et Raa, 1983), morue d'Atlantique (Brewer et *al.*, 1984), morue polaire (Arunchalam et Haard, 1985) et 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*). Il s'agit de la pepsine I, pepsine II a et b. D'après ces auteurs, ces pepsines sont des glycoprotéines et leur composition en acides aminés ressemble beaucoup plus à celle de la cathepsine D du porc que celle de la pepsine du porc.

Les extraits coagulants obtenus à partir des crustacées *Munida* par D'Ambrosio *et al.* (2003) ont été utilisés dans la fabrication de fromage. Ces protéases représentent d'après ces auteurs comme étant de bons substituts à la présure de veau.

Le tableau 10 donne les principales pepsines et pepsinogènes obtenus à partir de la muqueuse gastrique de divers poissons.

En Algérie, une étude a permis l'obtention de la pepsine à partir de l'estomac de divers poissons, notamment, le mérrou, le merlan et le limon. Nouani et *al.* (2002) ont étudié la possibilité d'utiliser l'extrait coagulant du merlan dont la fabrication du fromage type Edam. Cet extrait a donné un bon résultat. Maachou (2004) a étudié la pepsine de limon, les

caractéristiques de cette dernière diffèrent très peu de la présure traditionnelle. De même Ait Amer Meziane (2004) a utilisée la pepsine de limon dans la fabrication de fromage « Edam ».

Groupe majeur	Famille	Enzyme	Organisme purifié	Références	
Protéases gastriques	Protéases aspartiques	pepsine	- Eperlan d'Amérique	-Haard, Helbig et Feltham (1981).	
			- Sardine	-Noda et Murakami (1981) -Kim, Pyeun et Cho (1986)	
			- Capelin	-Gildberg et Raa (1983)	
			- Morue d'Atlantique	-Brewer et al. (1984) -Haard (1986) -Martinez et Olsen (1989) Gildberg, Olsen et Bjamason (1990) -Han (1993) -Karlsen, Hough et Olsen (1998)	
			- Morue de Groenland	-Squires et al. (1986)	
			- Saumon	-Reece (1988) -Sanchez – Chiang et al. (1987)	
			- Maquereau	-Kim et al. (1986) -Reece (1988)	
			- Roughy Orange	-Xu et al. (1996)	
			- Palmeta	-Pavliko et al. (1997 a)	
			- Thon	-Tanji et al. (1988)	
			Pepsinogène	- Truite	-Twining et al. (1983)
				- Thon	-Tanji et al. (1988)
				- Requin	-Nguyen et al. (1998)

Tableau 10 : Les protéases gastriques des poissons invertébrés et mammifères marins

(Shahidi et Janakkamil, 2001)

2.2- Les protéases d'origine végétale

Les protéases obtenues à partir de nombreuses espèces végétales, notamment, le figuier (*Ficus carica*), la papaye (*Carica papaya*), l'ananas (*Ananas sativa*) et l'huile des graines de ricin (*Ricinus communis*) ont la propriété de coaguler le lait (Garg et Johri, 1994). Cependant, leur application dans la fabrication fromagère avec le lait de vache n'a pas eu de succès puisque ces enzymes protéolysent plus le lait qu'elles ne le coagulent (Walstra et al., 1999).

Les coagulants d'origine végétaux montrent des caractéristiques avec la chymosine. Ce sont des protéines aspartiques qui hydrolysent la liaison peptidique Phe105 –Met106 de

la caséine κ (Macedo *et al.*, 1993) et leur activité protéolytique maximale sur la caséine est à pH 6 (Van Hooydonk *et al.*, 1986b ; Faro, 1991).

Depuis de nombreuses années, dans la Péninsule Ibérienne, les protéinases présentent dans les organes de fleurs de *Cynara genus*, *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis* et *Cynara scolymus*, ont été utilisées dans la fabrication de fromages traditionnels avec les laits de brebis et /ou chèvre (Vieira de Sà et Barbosa, 1972 ; Trujillo *et al.*, 1994).

La protéase extraite de fleurs de Cardon (*Cynara cardunculus*) utilisée traditionnellement au Portugal pour la fabrication de fromages a fait l'objet d'études pour ses propriétés coagulantes. Les mesures des paramètres cinétiques ont permis de mettre en évidence que la protéase de cardon a des caractéristiques très comparables aux autres agents coagulants du lait notamment chymosine, pepsine A de porc, pepsine C de porc, protéases de *Mucor miehei* et *Endothia parasitica* (Queiroz – Macedo *et al.*, 1993).

De récentes études réalisées sur les extraits coagulants obtenus à partir de fleurs de cardon d'Australie (*Cynara cardunculus* L.) ont montré, que contrairement avec le lait de vache, des fromages semi-hard (Pecorino) sont fabriqués avec le lait de brebis et sont de bonne qualité. Les fromages fabriqués avec l'extrait coagulant de *Cynara cardunculus* L. ont été comparés avec ceux fabriqués avec la présure commerciale et il en est convenu que ces premiers sont Doux , crémeux et moins amer (Chen *et al.*, 2003).

L'extrait coagulant obtenu à partir de *Cynara cardunculus* L. présente deux protéases acides aspartiques la cardosine A et la cardosine B (Pires, 1998). Les études menées par Heimgartner *et al.* (1990) ; Faro (1991) ; Faro *et al.* (1995) ; et Verissimo *et al.* (1996) ont montré qu'il est possible d'extraire et de purifier la cardosine A et la cardosine B à partir des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus* L.). Ces enzymes ont été également isolées et caractérisées par Pires (1998) ; Faro *et al.* (1999) ; Egas *et al.* (2000) et Vieira *et al.* (2001).

L'action de la cardosine A, obtenue de *C. cardunculus* sur les caséines des laits de brebis et de chèvre, a été rapportée par Ramalho-Santos *et al.* (1996) ; Simoes (1998) ; Sousa et Malcata (1998).

La cardosine A, comparable à la chymosine est responsable de l'activité coagulante spécifique puisqu'elle coupe la caséine κ au niveau de la liaison peptidique Phe105 – Met106. Tandis que la cardosine B , similaire à la pepsine est la principale responsable de l'activité protéolytique donnant au fromage une douceur , une texture de beurre et une saveur crémeuse (Faro *et al.*, 1993 ; Macedo *et al.*, 1993 ; Silva et Malcata, 2005).

Les fromages (tels que Serra da Estrela) fabriqués avec l'extrait coagulant de *Cynara cardunculus* L. ont une texture unique et une saveur caractéristique. Une autre espèce végétale *Cynara humilis* L. est également utilisée pour la fabrication de fromages (Esteves *et al.*, 2002).

Seule la cardosine A a été détectée de l'extrait coagulant obtenu à partir de *Cynara humilis* L.. Cette enzyme est similaire à l'enzyme obtenue à partir de *Cynara cardunculus* et par conséquent possède une activité et une spécificité similaires à la chymosine (Pires *et al.*, 1994). Selon Esteves *et al.*, (1995) et Pires (1998) , la cardosine B obtenue à partir de *C. humilis* est beaucoup plus protéolytiques sur la caséine que la cardosine A.

D'autres espèces végétales ont fait l'objet de plusieurs études afin de pouvoir extraire et donc substituer l'agent coagulant de la présure animale. On effet, Oner et Akar (1993) ont étudié la ficine, extrait enzymatique du figuier (*Ficus carica* L.) et ont pu de déterminer que le rapport de l'activité coagulante à l'activité caséinolytique est très faible. Ces auteurs

ont précisés que l'emploi de cet extrait à l'état brut dans la fabrication de fromage est défavorable.

En Algérie, le pouvoir coagulant sur le lait de vache de certaines protéases extraites de différentes plantes locales a été étudié puis comparé à celui d'une présure commerciale d'origine animale. Il s'agit de la protéase de latex de figuier (*Ficus carica* L.) (Morsli ,1997 ; Ball Ibrahima, 2000), celle de cardon sauvage (*Cynara cardunculus* L.) (Tsouli, 1979 ; Mouzali, 2001), celle de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) (Tsouli ,1979 ; Morsli ,1997), ainsi que la protéase extraite des graines de melon (*Cucumis melo* L.) (Fernani ,2003 ; Garidi et Guessou, 2006).

2.3-Les protéases d'origine microbienne

2.3.1-Les protéases d'origine bactérienne

Des études ont permis de mettre en évidence les potentialités de certaines bactéries à produire des coagulases .Parmi ces bactéries, nous pouvons citer : *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* et *Bacillus licheniformis* (Green ,1977).

Il a été noté que ces enzymes présentaient une activité protéolytique trop élevée par comparaison à la présure dans les mêmes conditions de la coagulation du lait ; les caillés obtenus manquaient de cohésion (Alais ,1984 ; Mahon et Brown, 1985).

En Algérie , une étude a permis de mettre en évidence la possibilité d'obtenir une coagulases à partir d'une souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33) (Matoub, 2000), et une autre à partir d'une souche locale de *Bacillus subtilis* S₃ et *Bacillus coagulans* (Chemlal, 1998).

2.3.2-Les protéases d'origines fongique

C'est parmi les enzymes fongiques que l'on trouve les protéases coagulantes les plus satisfaisantes pour la fromagerie car le rapport de leur activité coagulante à leur activité protéolytique se rapproche de celui de la chymosine .Pratiquement ,trois moisissures ont été retenues par l'industrie des fermentations pour produire les présures de remplacement ; ce sont *Endothia parasitica* (moisissure parasite du châtaigner), *Mucor pusillus* (moisissure mésophile du sol) et *Mucor miehei* (moisissure thermophile du sol) (Desmazeaud, 1981).

Il semble que les cultures à base de *Mucor miehei* soient les plus utilisées pour les préparations industrielles d'enzymes coagulantes .Par ailleurs, les enzymes fongiques se caractérisent par une stabilité thermique analogue à celle de la présure (Gourseaud ,1993). De même, contrairement aux protéases bactériennes, les protéases fongiques ont donné de meilleurs résultats, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure (Luquet, 1985).

En Algérie une étude à permis de mettre en évidence la possibilité d'obtenir une protéase coagulant le lait à partir de culture de *Mucor pusillus* par Belhamiche (2006). Il s'est avéré que ses propriétés sont presque relativement similaires à celles de la présure traditionnelle. De même Ounes (2004) a pu obtenir un fromage « Edam », fabriqué à partir de cette protéase.

2.4- Production de la chymosine par voie microbienne

Les techniques du génie génétique ont permis de préparer une présure formée de chymosine pure. Elle résulte du clonage du gène sur certains micros organismes

(*Escherichia coli*, *Kluyveromyces* et *Aspergillus*) (Alais et Linden, 1997 ; Mahaut et *al.*, 2000).

Sur le plan technologique, en ce qui concerne les modalités de la coagulation, de l'égouttage, de l'affinage et les caractéristiques organoleptiques, aucune différence majeure n'a été détectée entre les produits obtenus avec les chymosines génétiques et la présure traditionnelle (Eck, 1990).

III. LES MECANISMES DE LA COAGULATION DU LAIT

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

La coagulation du lait correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel de la caséine du lait. En fromagerie, la déstabilisation du système colloïdal est réalisée soit par voie fermentaire à l'aide de bactéries lactiques, soit par voie enzymatique à l'aide de d'enzymes coagulantes, en particulier la présure.

Les mécanismes d'action de ces deux agents coagulants (présure et acide lactique) au niveau de la micelle sont très différents. Bien qu'ils conduisent tous deux à la formation d'un réseau protéique appelé coagulum (gel ou caillé), les propriétés rhéologiques de ce dernier restent caractéristiques du mode de coagulation (FAO, 1998).

1- La coagulation par acidification lactique

Sous l'action de bactéries lactiques, le lactose se transforme progressivement en acide lactique. Cette acidification du lait entraîne une neutralisation des charges négatives portées par les caséines ainsi qu'une déminéralisation progressive des micelles qui se désintègrent en sous unités micellaires. Dans le même temps, cette acidification entraîne une solubilisation partielle des caséines αs_1 , αs_2 et κ à température ambiante, qui s'amplifie à 4°C.

Lorsque le pH est voisin de 5(point isoélectrique de la caséine), la charge des submicelles est très réduite et la précipitation des caséines s'amorce, la neutralisation des charges est complète ; les micelles de caséines flocculent et se soudent formant au repos un gel homogène qui emprisonne le lactosérum et occupe entièrement le volume de lait. Au cours de la déminéralisation du complexe phosphocasinatate de calcium, le calcium colloïdal migre dans le sérum.

Le gel ainsi formé présente une perméabilité satisfaisante, mais une friabilité élevée avec une élasticité et plasticité pratiquement nulles dues au manque de structuration du réseau. (Le noir et *al.*, 1985 ; Mietton et *al.*,1994 ; Mahaut et *al.*,2000).

2- La coagulation par voie enzymatique

La coagulation par l'action des enzymes protéolytiques (présure ou autre protéase coagulante) comprend trois phases :

- phase enzymatique ou réaction primaire, au cours de laquelle, la chymosine dégrade la caséine κ de façon spécifique ;
- phase de coagulation ou phase secondaire qui correspond à la formation du gel ;
- phase de réticulation ou réaction tertiaire ou protéolyse générale.

La figure 2 résume les trois phases de la coagulation enzymatique du lait.

2.1 –hydrolyse enzymatique de la caséine κ

L'hydrolyse enzymatique ou la phase enzymatique correspond à une protéolyse limitée de la caséine κ , portant sur la liaison Phe 105– Met 106. La chaîne peptidique de la caséine κ est ainsi coupée en deux segments inégaux de caractéristiques différentes (Dalglish, 1993 ; Alais et Linden, 1997 ; Mahaut et al., 2000) :

- le segment 1-105 ou para caséine κ est hydrophobe, basique et reste intégré à la micelle ;
- le segment 106-169 ou caséinomacropéptide (C.M.P) est très hydrophile, acide et passe dans le lactosérum.

La libération du caséinomacropéptide entraîne une diminution de l'électronégativité de la micelle et donc une diminution des forces de répulsion électrostatique ainsi que du degré d'hydratation (Mahaut et al., 2000).

Cette réaction primaire (spécifique) est très rapide et constitue avec la réaction tertiaire (non spécifique et lente) de protéolyse générale le premier stade enzymatique de la coagulation du lait (Cheeseman, 1981 ; Lenoir, 1985 ; Wigley, 1996).

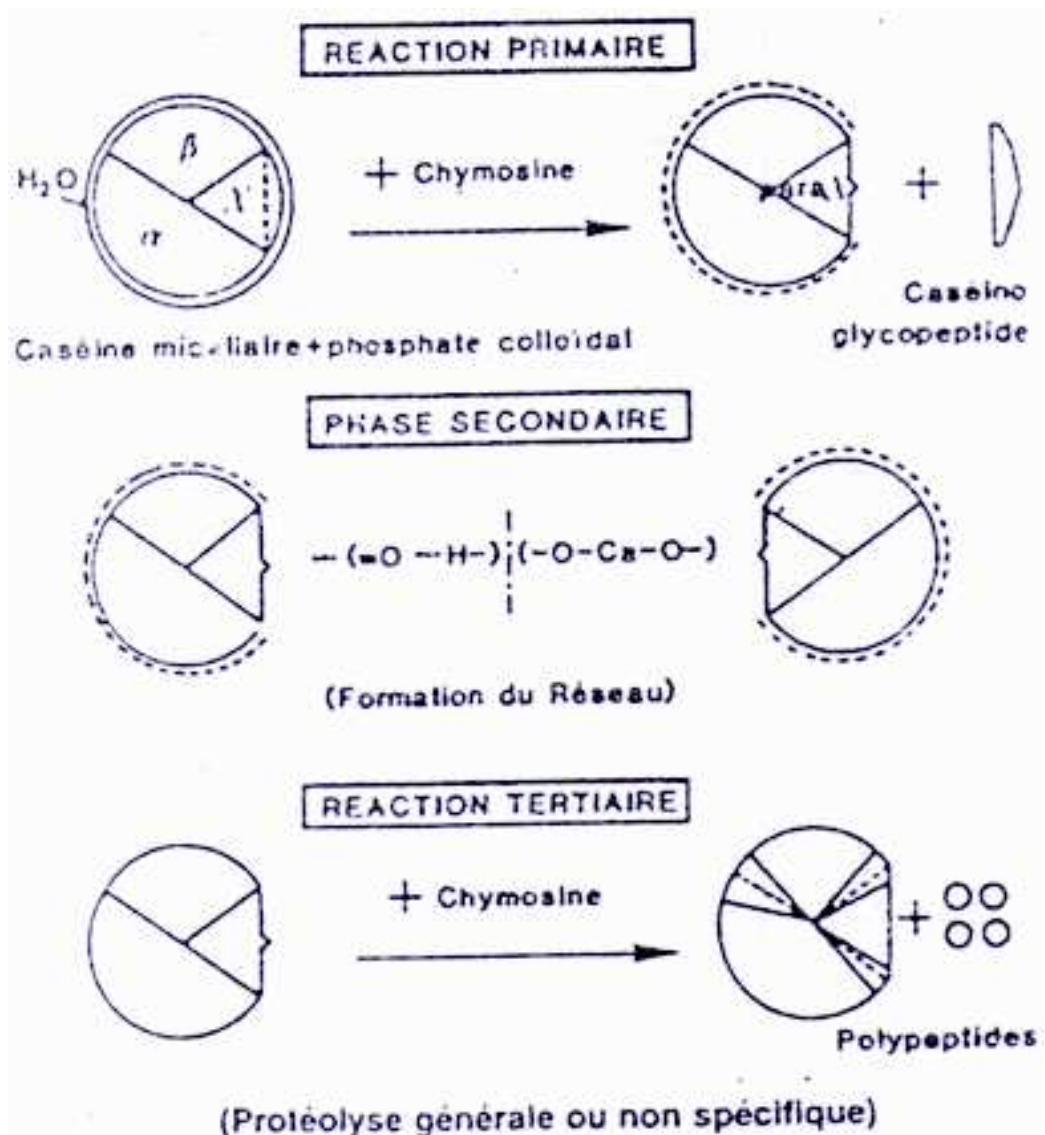


Figure 2 : Les trois phases de la coagulation enzymatique du lait (Alais & Linden, 1997).

2.2- Phase de coagulation

A pH 6.6, lorsque 80 à 90 % de la caséine κ est hydrolysée, le caséinomacropéptide se détache de la caséine κ et la micelle perd son caractère hydrophile : il y a diminution de son degré d'hydratation. Des liaisons électrostatiques, hydrophobes et salins s'établissent entre les micelles agrégées pour former un gel constitué par un réseau lâche emprisonnant le lactosérum et la matière grasse. Dans le gel ainsi formé, la caséine est présente sous une forme fortement minéralisée et ce degré de minéralisation élevé confère au gel présure des caractères différents de ceux du gel lactique. Le gel présure est souple, très corrosif, imperméable et contractile (Lenoir et al., 1985 ; Eck, 1990 ; Mahaut et al., 2000).

2.3 – Phase de réticulation

Elle consiste en une protéolyse générale et proportionnelle à la concentration en enzyme. Elle n'intervient pas directement dans le phénomène de coagulation proprement dite. C'est une réaction lente et non spécifique car elle concerne toutes les caséines. Elle débute lentement avec la réaction primaire et se poursuit durant l'affinage.

3 - la coagulation mixte

Elle est réalisée par action conjointe de la présure et de l'acide lactique. Cependant, la formation du coagulum se fait généralement sous l'action dominante de la présure. C'est ensuite, progressivement qu'il acquiert des caractères lactiques. Cette opération se pratique pour l'obtention de fromages frais (petits suisses, demi-sels, etc.) et de fromages à pâte molle (camembert, brie, etc.). Selon les pâtes, il y aura utilisation d'une dose bien précise de présure et de levains lactiques (Ramet, 1998).

Le coagulum obtenu présente des caractères intermédiaires entre ceux des gels lactiques et de la présure. Il est caractérisé par une souplesse et une contractilité moins, une fermeté et une friabilité plus accentuées que celles du gel présure (Veisseyre, 1975).

IV. LES FACTEURS DE LA COAGULATION ENZYMATIQUE DU LAIT

De nombreux facteurs sont susceptibles de modifier la coagulation du lait et les caractéristiques physiques du coagulum :

1 – Concentration en enzyme

Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en enzyme, ce qui peut se formaliser selon l'équation empirique suivante :

$$T_c = k / E + T_a$$

Avec :

T_c = temps de coagulation ;

K = inverse de la constante de vitesse ;

E = concentration en enzyme ;

T_a = temps écoulé entre la fin de la réaction enzymatique et le point de coagulation.

Cette équation empirique est vérifiée entre 25 °C et 40°C et pour un temps de coagulation compris entre 2 et 40 minutes.

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

2- Température

La température optimale d'activité de la chymosine et de la pepsine est de 40- 42°C. A une température inférieure à 10°C , la coagulation du lait ne se produit pas . Entre 10 et 20°C, le temps de floculation est long puis décroît pour devenir minimum vers 40-42°C.Ce dernier augmente aux températures plus élevées et devient nulle à 65 °C (température d'inactivation de la présure) (Ramet et Hardy ,1973 ; Ramet et Weber , 1980) .

Bien que le temps de raffermissement du gel présure diminue aux dessus de 30°C, on note que l'indice de fermeté diminue avec l'élévation de la température (Ramet et Weber, 1980).

L'influence de la température sur le temps de coagulation résulte de trois effets (Mietton et *al.*, 1994) :

- La thermo sensibilité de l'enzyme ;
- la vitesse d'agrégation ;
- et la vitesse de raffermissement du gel.

3- pH

Le pH d'emprésurage joue un rôle important sur les caractéristiques du gel et l'abaissement du pH du lait entraîne une réduction du temps de coagulation (Mietton, 1989).

En passant de pH 6,7 à 5,6, la vitesse de coagulation s'accroît. Ceci résulte d'une augmentation de la vitesse d'hydrolyse de la caséine κ . Cet accroissement de la vitesse de coagulation par l'abaissement de pH entraîne une augmentation de la vitesse de raffermissement, et par suite une diminution du temps de raffermissement (Kowalchyk et Olson, 1977 ; Ramet et Weber ,1980).

La fermeté est significativement accrue de pH 6,6 à 6,0, ce qui est dû à une plus grande disponibilité du calcium ionisé (Ramet et Weber, 1980). Au dessous de pH 6,0, la caséine se déminéralise, et la désagrégation de la structure micellaire est accrue jusqu'à devenir totale à pH 5,2 à 40°C. Il en résulte un affaiblissement du réseau.

En revanche, il n'y a plus de coagulation à des pH supérieurs à 7,0 ; en effet, l'enzyme est rapidement inactivée (Eck ,1990).

4- Teneur en calcium

La réticulation du gel lors de la coagulation du lait par la présure, impliquant des liaisons phosphocalciques, est particulièrement influencée par la teneur et la nature du calcium présent .L'addition du CaCl_2 entraîne une augmentation du calcium ionisé et du calcium colloïdal ayant pour conséquence une augmentation de la taille des micelles et un abaissement du pH par dissociation des groupements phosphoriques et carboxyliques des protéines.Le temps de prise est plus court et la fermeté du gel est plus élevée (Alais, 1984 ; Lenoir ,1985).

MATERIEL & METHODES

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

1- Matières premières employées

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*)(Figure 3).
- La muqueuse stomacale ou l'estomac provenant du système digestif du limon (*Seriola sp.*)(Figure 4).

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 (notamment la pepsine),teneur de l'enzyme recherchée (pepsine) dans ces tissus et donc leur emploi comme substituts à la présure constituerait la valorisation de ces co-produits d'abattage.

La présure commerciale, habituellement utilisée en technologie fromagère, a été employée dans notre expérimentation pour l'étude de la caractérisation des préparations enzymatiques purifiées. Elle provient de la LFB de Boudouaou sous forme de poudre. Son activité enzymatique est exprimée en force coagulante (Unité Soxhlet) (TSOULI ,1979).

La concentration de la présure est ajustée par dilution dans du tampon acétate à 0.1 M ; pH=5 pour avoir le temps de coagulation nécessaire.

2-Obtention et préparation des matières premières

2.1-Obtention

Les pro ventricules de poulet qui sont disponibles pendant toute l'année sont obtenus au niveau d'un complexe avicole de Bordj El-Bahri. Les estomacs de limon sont obtenus au niveau de la pêcherie de Bab El-Oued. Cette matière est disponible hors saison de la période de reproduction du limon.

La quantité de matières premières récupérées pour les besoins de nos essais est d'environ 500 g pour l'origine avicole et 500 g pour l'origine marine.

2.2-Préparation

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 morceaux ,conditionnées dans des sacs en plastique et enfin congelées à -18°C.

II. EXTRACTION DE L'ENZYME

Les pro ventricules de poulet ainsi que les estomacs de limon sont décongelés et broyés à l'aide d'un mixeur (type : appareil ménager) dans quatre solutions différentes (annexe 1) : 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.

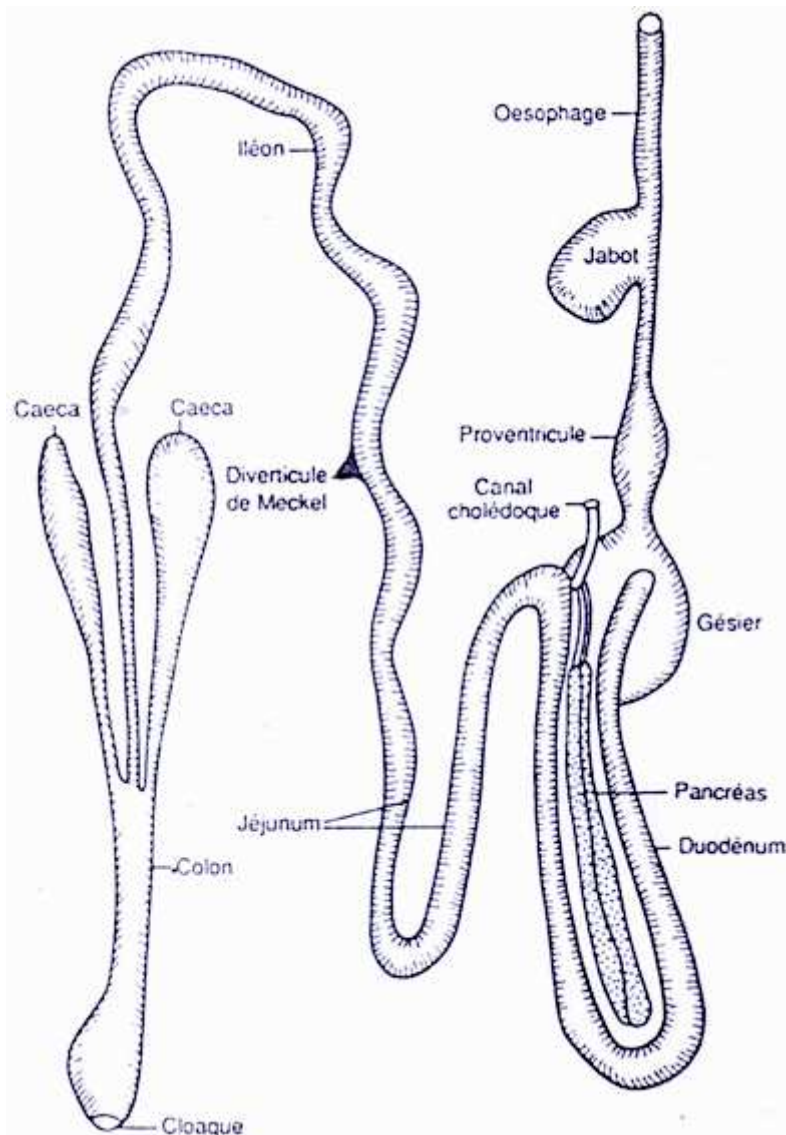


Figure 3 : Anatomie de l'appareil digestif des gallinacées (Larbier & Leclerq, 1992).

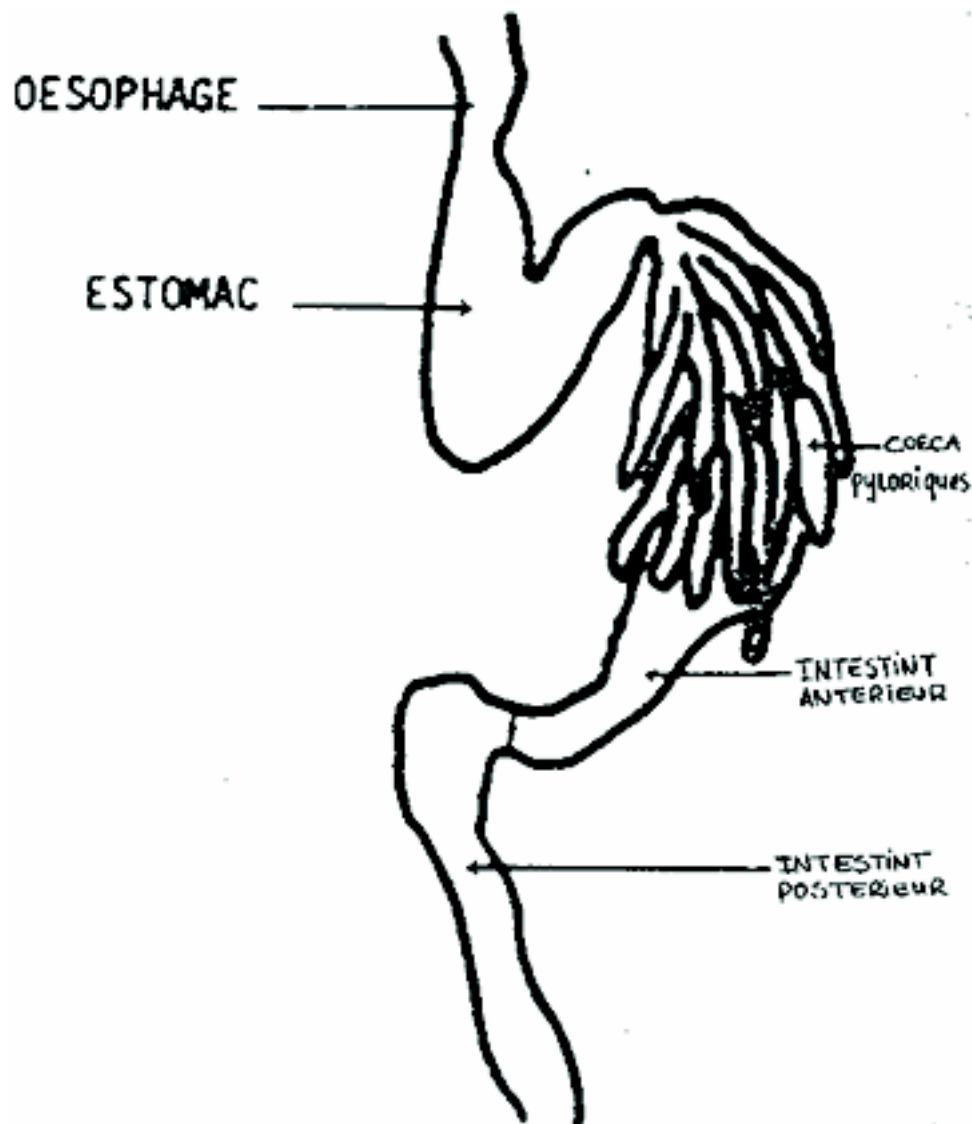


Figure 4 : Schéma du tube digestif de limon (*Seriola sp.*)

(Gas & Noaillac-Depeyre, 1981).

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 (RIFAAT et al., 1970) puis filtré sur papier filtre. Le surnageant obtenu est ajusté à pH 5 pour la stabilisation de l'enzyme (figure 5).

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).

- 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. On obtient ainsi l'extrait enzymatique brut. Celui-ci est congelé à -18°C et servira ultérieurement.

III. METHODES DE PURIFICATION

Les pepsines de poisson ont été purifiées principalement par précipitation avec le sulfate d'ammonium suivie par une dialyse, une chromatographie d'échange ionique, une chromatographie d'exclusion moléculaire et une électrophorèse (Gildberg et Raa ,1983 ; De-Vecchi et Coppes, 1996 ; Simpson, 2000).

Les extraits coagulants clarifiés obtenus à partir de pro ventricules de poulet de l'estomac de limon sont purifiés selon les méthodes résumées par la figure 6.

1- Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

L'addition de sulfate d'ammonium à une solution protéique provoque une déshydratation et une précipitation des protéines, induisant ainsi le phénomène de « relargage » ou « salting-out ». Ce résultat est dû essentiellement à la compétition entre les ions salins ajoutés et les autres solutés dissous pour la solvataion des molécules. Les protéines précipitées par « salting-out » ne sont pas dénaturées et les ions qui diminuent leur solubilité stabilisent leurs structures natives (Voet et Voet, 1998).

PRO VENTRICULES / ESTOMACS

↓

Broyage : (1/3) Masse de la matière première / volume de la solution tampon acétate (0,1M ; pH 5).**Congélation** (-18°C / 24 heures).

↓

Décongélation (+ 4°C)

↓

Macération (avec agitation douce : 3 à 4 heures).

↓

Filtration sur gaze

↓

Centrifugation (3200g / 15 minutes).

↓

Filtration (papier wathman).

↓

Stabilité enzymatique (abaissement du pH jusqu'à 2 avec HCL concentré. Après 15 minute, réajustement du pH jusqu'à 5 avec NaOH).

↓

Clarification (+1% sulfate d'aluminium, 1M + 5% sulfate disodique, 1M à 35°C pendant Quelques minutes avec agitation).

↓

Centrifugation (2500g / 15 minutes).

↓

Filtration (papier wathman).

↓

Extrait enzymatique brut (conservé à -18°C).

Figure 5 : Les principales étapes suivies pour l'obtention des extraits coagulants bruts à partir de pro ventricules de poulet (*Gallus gallus*) et des estomacs de limon (*Seriola sp.*).

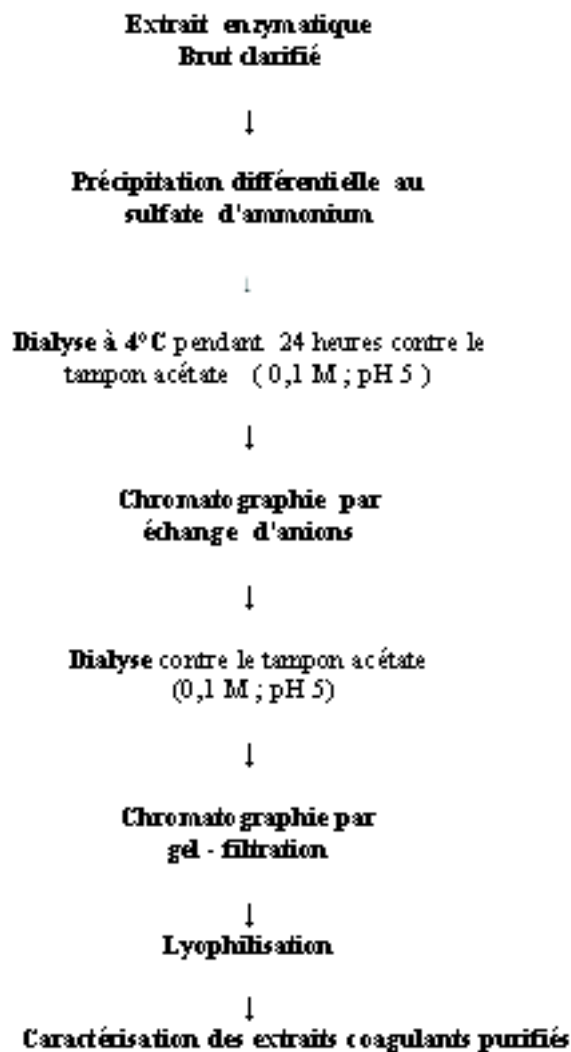


Figure 6 : Les différentes étapes suivies au cours de la purification des extraits enzymatiques bruts obtenus à partir de pro ventricules de poulet (*Gallus gallus*) et des estomacs de limon (*Seriola sp.*)

La précipitation des extraits enzymatiques clarifiés est réalisée sous agitation lente par addition progressive de sulfate d'ammonium à des taux de saturation variant de 10% à 80%. Les solutions enzymatiques ainsi saturées sont mises à décanter pendant 16 heures à +4°C puis centrifugées à 10000 tr / minutes pendant 30 minutes à + 4°C. Les surnageants et les culots sont récupérés pour estimer l'activité enzymatique selon la méthode de Berridge modifiée par Collin et al. (1977). Le culot est mis en suspension dans la solution tampon acétate (à 0,1M ; pH= 5) pour être dialysé.

2 –Dialyse

La dialyse, qui n'est pas une technique chromatographique, est utilisée systématiquement pour changer le solvant dans lequel sont dissoutes les macromolécules. C'est une technique qui permet de séparer les molécules selon leur taille, grâce à l'utilisation de membranes semi-perméables qui présentent des pores de taille inférieure aux dimensions macromoléculaires. Ces pores permettent aux petits molécules, telles que : sels, solvant et

de petits métabolites de diffuser au travers de la membrane mais bloquent le passage de molécules plus grandes (Voet et Voet ,1998).

La suspension protéique précipitée est placée dans un tube fait d'une membrane semi-perméable dont le seuil de rétention est égal à 5000 Daltons. On referme les deux bouts du tube. Le sac à dialyse ainsi formé est placé dans la solution de contre dialyse (Tampon acétate à 0,1 M ; pH=5) pendant 24 heures à +4°C, sous agitation lente. La solution tampon de contre dialyse est renouvelée toutes les 4 heures.

3-Chromatographie par échange d'anions

Comme le pH_i de la pepsine est inférieur ou égale à 1, on a opté pour un échangeur anionique : le DEAE cellulose A52.

La chromatographie échangeuse d'anions permet de séparer les protéines selon leurs charges. En effet, sur une phase stationnaire échangeuse d'anions, les protéines chargées négativement seront retenues. Par contre, les protéines chargées positivement sont éluées en premier. En suite, les protéines retenues sur l'échangeur anionique sont ensuite éluées en modifiant la force ionique de l'éluant.

Dans notre étude, le DEAE cellulose (DE 52) en solution (2 g / 20ml du tampon acétate 0,1 M ajusté à pH=5) est dégazé puis versé dans la colonne (1 x 20 cm), fixée verticalement et équilibrée avec le même tampon.

Un volume de 1ml de solution enzymatique concentrée est déposé délicatement sur la surface du gel. L'éluion des protéines non adsorbées se fait avec le tampon acétate (0,1 M ; ajusté à pH=5) sous un débit constant de 45 ml / heure. Après avoir éliminer toutes les protéines non adsorbées (D.O= 0 nm), on place l'appareil de gradient linéaire NaCl de force ionique allant de 0 à 0,5 M préparé dans le même tampon pour l'éluion des protéines.

La lecture de l'absorbance des fractions éluées est réalisée à 280 nm. Les fractions présentant une activité coagulante sont rassemblées et dialysées contre le tampon acétate (0,1 M ; pH=5) pendant 16 heures à + 4°C.

4-Chromatographie par gel – filtration

Dans la chromatographie par gel – filtration, appelée également chromatographie par exclusion ou par tamisage moléculaire, les protéines sont séparées suivant leur taille et leur poids moléculaire. Ici le gel est constitué de grains poreux calibrés. Les molécules les plus grosses sont recueillies les premières, les autres plus petites sont éluées tardivement.

Nous avons utilisé comme support le gel sephadex G-75 (gel livré sous forme de poudre extra- fine) dont le domaine de fractionnement est compris entre 30 000 et 70 000 Daltons. 12 à 14 g de gel G-75 sont mis à gonfler dans la solution tampon acétate (0,1 M ; pH=5) pendant 24 heures à température ambiante puis dégazés dans un erlen meyer muni d'un dispositif permettant de faire le vide . Le contenu de l'erlen meyer est agité constamment pour permettre au gaz de s'échapper.

Le remplissage de la colonne (1,5 x 30 cm) se fait au fur et à mesure que le gel se décante dans la colonne, tout en évitant la formation de bulles d'air, ce qui pourrait modifier la régularité du débit.

Un volume de 1 ml d'extrait enzymatique est élué avec le tampon acétate (0,1 M ; pH 5) avec un débit de 14,4 ml / heure. La lecture des densités optiques est réalisée à 280

nm. Les fractions douées d'une activité coagulante sont rassemblées et concentrées puis conservées.

5-Concentration avec le saccharose

Elle consiste à réduire la quantité d'eau présente dans l'échantillon en utilisant le principe de dialyse contre le saccharose. Les extraits coagulants bruts ainsi que les fractions actives, recueillies après chaque étape de purification (échange d'anions, gel -filtration), sont réparties dans les sacs se dialyse puis placées sur une couche de saccharose dans un récipient maintenu à + 4°C pendant 2 à 3 heures.

6- Lyophilisation

La lyophilisation est un procédé de concentration et de conservation des protéines.

Elle comporte deux étapes ; la congélation puis la sublimation (passage sous vide directement de l'état solide à l'état vapeur) (Kamoune, 1998). Les fractions actives rassemblées sont congelées et lyophilisées..

IV. ETUDE DES EXTRAITS COAGULANTS BRUTS ET PURIFIES

1- 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.

L'unité de présure est calculée selon l'expression suivante :

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

Avec :

UP= unité de présure ;

V= volume du lait ajusté à pH 6,4 et porté à une température de 35°C ;

v= volume de la solution enzymatique ;

t= temps de coagulation du lait en secondes.

1.1-Préparation du substrat de Berridge

Le substrat utilisé pour la mesure de l'activité coagulante est du lait écrémé reconstitué du type « low heat » (Berridge, 1945 ; in Collin et al ., 1977).

Une quantité de 12 g de lait en poudre écrémé (lait en poudre écrémé utilisé par la LFB de Boudouaou) est dissoute dans 100 ml de solution de chlorure de calcium (CaCl_2) 0.01 M sous agitation magnétique douce pendant 30 minutes. Le pH de substrat ainsi préparé est ajusté à 6,4. Le lait, ainsi reconstitué, est maintenu pendant 30 minutes au bain marie à 35°C pour sa stabilisation.

1.2-Mesure du temps de coagulation

Le temps de coagulation du lait est déterminé selon la méthode décrite par Collin et al., (1977) qui consiste à ajouter 1 ml de la solution enzymatique à 10 ml du substrat de Berridge (Figure 7) .

Le temps de coagulation du lait par les enzymes est mesuré à partir du moment de l'addition de la solution enzymatique jusqu'au moment où les premiers flocons de caséines, adhérant à la paroi interne du tube à essai incliné et subissant une lente rotation dans un bain marie à 35°C, sont visibles à l'œil nu.

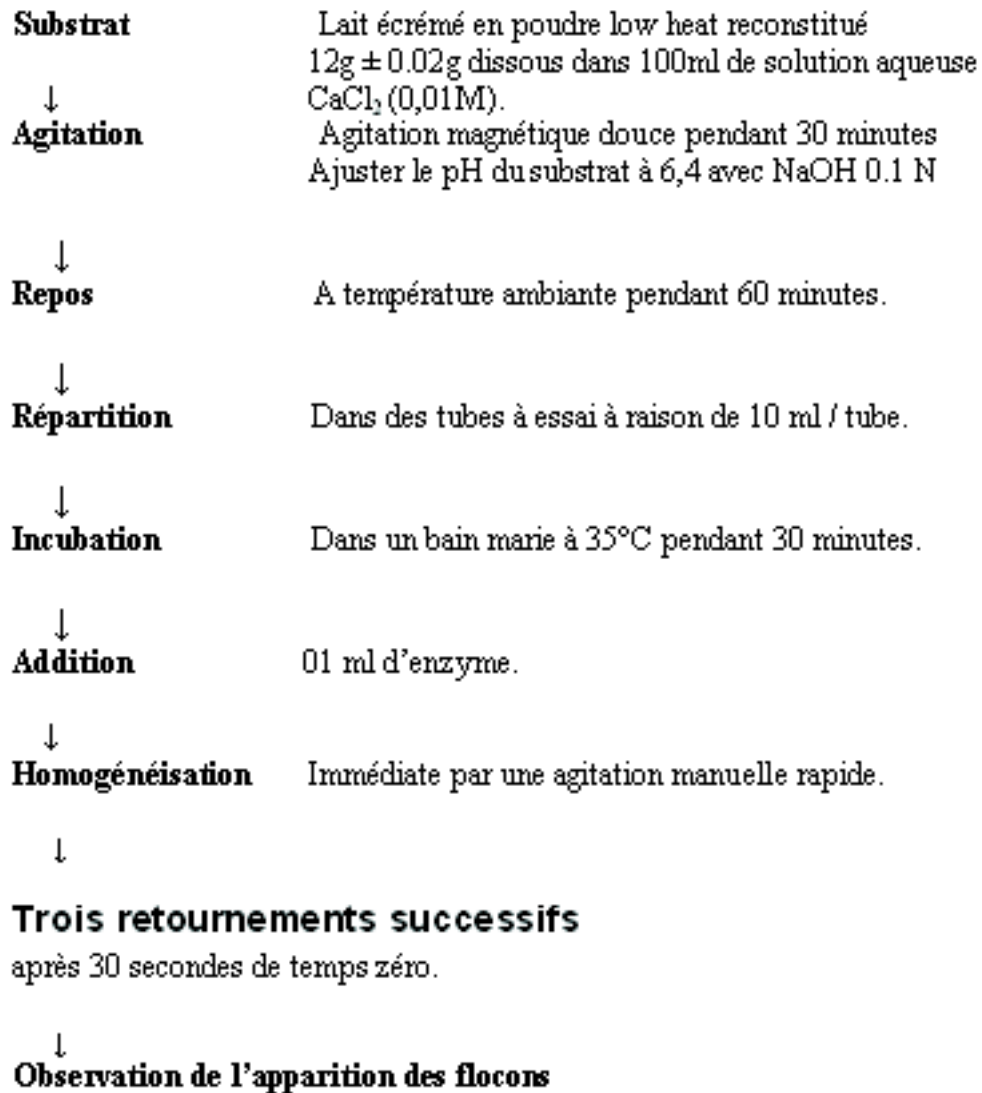


Figure 7 : Mesure du temps de coagulation selon la méthode de Berridge (1945), modifiée par Collin et al. (1977).

2- Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales des extraits coagulants a été réalisé par la méthode de Kjeldahl et par celle dite de Lowry.

2.1- Méthode de Kjeldahl

La matière azotée totale d'un échantillon est déterminée conventionnellement par la méthode de Kjeldahl (annexe 2). Le principe de cette méthode consiste à transformer l'azote organique en sulfate d'ammonium sous l'action de l'acide sulfurique concentré à chaud en présence d'un catalyseur approprié et de doser, après déplacement en milieu alcalin et distillation, l'ammoniac formé, recueilli dans de l'acide borique, à l'aide d'une solution sulfurique (N/50) (Jarrige.1989).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche (% MS).

2.2-Méthode de Lowry

Cette méthode a été développée par Lowry et al. (1951) qui ont combiné une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu (annexe 3). Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle de biuret. L'addition au réactif du sulfate de cuivre augmente considérablement la sensibilité de la méthode.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration protéique contenue dans les extraits. Cette concentration est déterminée à l'aide d'une courbe étalon établie en utilisant le sérum d'albumine bovine (B.S.A à 200µg / ml) comme protéine standard

(Figure 1, annexe 3).

3- Mesure de l'activité protéolytique des extraits coagulants purifiés

La mesure de l'activité protéolytique des extraits coagulants purifiés est déterminée par la méthode de Green et Stackpole (1975) (annexe 4).

L'objectif de cette mesure est l'évaluation du taux de dégradation du substrat (Caséine) pendant la réaction primaire. Pour cela, on mesure la concentration en produits d'hydrolyse de la caséine, solubles dans de l'acide trichloracétique (T.C.A) à 12 %. Le dosage des peptides solubles est effectué selon la méthode préconisée par Lowry et al. (1951) (Annexe 3).

Les résultats s'expriment en terme de concentration de tyrosine (µg / ml) d'extrait enzymatique (Federici, 1982) par référence à une courbe étalon, établie à partir de concentration croissante en tyrosine, variant de 10 à 100µg/ ml (Figure 1, annexe 4).

Pour l'étude de l'activité protéolytique, la concentration des extraits coagulants est ajustée de façon à obtenir un temps de coagulation voisin de 5 minutes, selon les conditions standard de mesure de l'activité coagulante.

V. CARACTERISATION DES EXTRAITS COAGULANTS PURIFIES

La caractérisation des extraits enzymatique purifiée consiste à déterminer les conditions optimales de l'activité coagulante en fonction de certains paramètres. La mesure de l'activité coagulante est déterminée en mesurant le temps de coagulation selon la méthode de Berridge (1945) modifiée par Collin et al. (1977).

Une dilution préalable des extraits coagulants est réalisée afin d'obtenir un temps de coagulation compris entre 05 et 10 minutes sur un substrat standardisé (substrat de Berridge).

1- 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.

2- 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 7,0.

3- 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 0,01 M à 0,09 M.

4- Influence de la concentration en extrait enzymatique

Les activités coagulantes ont été déterminées en faisant varier la concentration en protéines de l'extrait de 20 µl à 200 µl .

5- Etude de la stabilité des extraits enzymatiques

5.1- Stabilité thermique

La stabilité thermique des extraits a été étudiée en mesurant leur activité coagulante résiduelle après incubation des extraits enzymatiques à des températures variables de 30 à 60°C pendant 30 minutes.

5.2- Stabilité au cours de la conservation

Les extraits coagulants sont conservés à +4°C et à -18°C pendant 03 mois . L'activité résiduelle est mesurée périodiquement.

RESULTATS & DISCUSSION

I. RESULTATS DES EXTRACTIONS

1- Quantité de matière première récupérée

Après pré-traitement, 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 11.

Solutions d'extraction	Temps de coagulation (en secondes)	
	Poulet	Limon
Acétate de Na (0,1 M et pH 5)	7,5	44
Citrate de Na (0,1 M et pH 5)	11	59
Phosphate de Na (0,1 M et pH 5)	9	50
NaCl (5%)	13	51

Tableau 11 : Temps de coagulation obtenus avec les différentes solutions d'extraction pour les deux extraits bruts de poulet et de limon.

D'après le tableau 11, nous constatons que c'est la solution tampon acétate qui 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.

Morsli (1997), en utilisant plusieurs solutions d'extraction (acétate de Na, NaCl à 5% et acide borique à 0,2%), obtient le même temps de coagulation pour la pepsine de poulet (7,5

secondes). Maachou (2004), avec le tampon acétate, obtient un temps différent du notre en ce qui concerne la pepsine de limon (30 secondes).

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.

Les extraits enzymatiques obtenus à partir des pro ventricule de poulet et estomac de limon se caractérisent 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 ;
- une force coagulante de 1 / 3200 pour l'EEB de poulet et 1 / 545,45 pour l'EEB de limon ;
- un taux en protéines de 147.3 mg / ml pour l'EEB de poulet et 35 mg / ml pour l'EEB de limon.

II. PURIFICATION DES EXTRAITS COAGULANTS BRUTS

La purification a pour objectif principal d'obtenir une protéase pure. Pour isoler la protéine coagulante des autres protéines contaminantes, les extraits enzymatiques issus de pro ventricule de poulet et d'estomac de limon vont subir plusieurs étapes de purification. A près chaque étape, l'activité coagulante totale, la quantité totale de protéine, l'activité spécifique, le rendement en activité ainsi que le facteur de purification pour les deux pepsines sont déterminés.

1 – Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

Les valeurs, illustrées par le tableau 12, nous permettent de constater que la précipitation est totale à un taux de saturation de 50 % pour l'extrait brut de limon et l'extrait brut de poulet. Les précipités de poulet et de limon ainsi recueillis sont récupérés dans un minimum de tampon acétate de Na (0,1 M, pH 5), dialysés puis concentrés avec du saccharose. Ces derniers vont constituer les extraits enzymatiques pour la suite de notre étude.

Taux de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	Temps de coagulation (secondes) pour l'EEB de poulet		Temps de coagulation (secondes) pour l'EEB de limon	
	Surnageant	Culot	Surnageant	Culot
10	90	170	143	220
20	120	120	284	175
30	260	60	500	122
40	660	30	985	102
50	0	23	0	90
60	0	23	0	90
70	0	23	0	90

Tableau 12 : Précipitation différentielle des extraits enzymatiques bruts de Poulet et de limon au sulfate d'ammonium

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

L'extrait enzymatique précipité au sulfate d'ammonium à 50% de saturation, dialysé puis concentré avec du saccharose présente, d'après le tableau 13, 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 8, 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%.

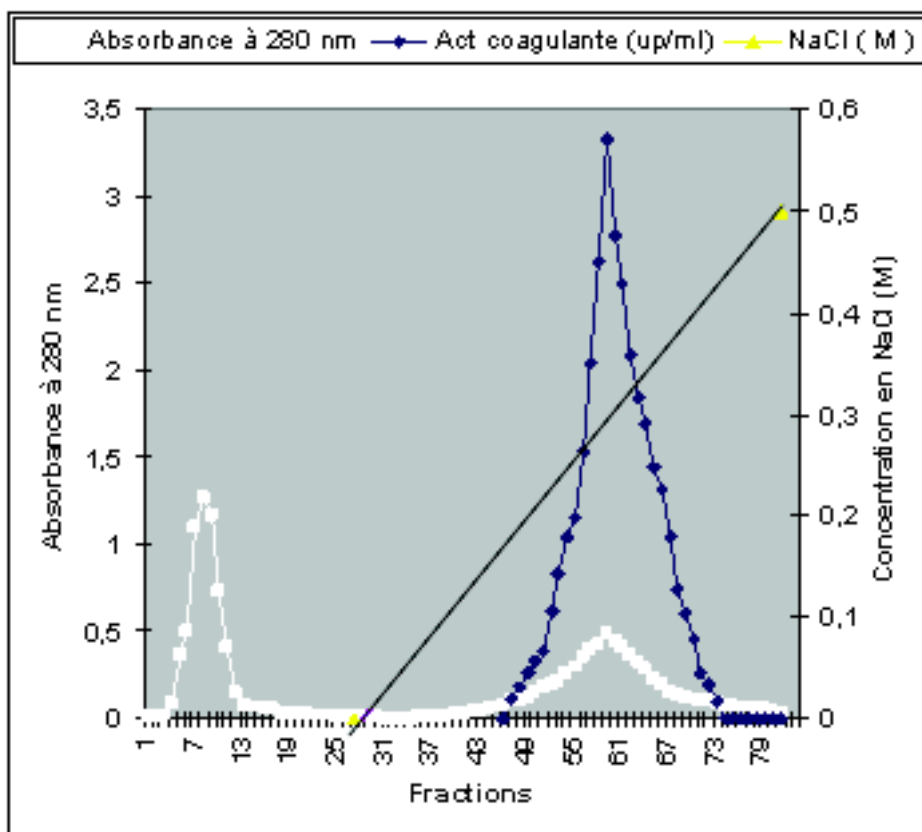


Figure 8: Profil d'éluion sur DEAE-cellulose (A52) de l'extrait coagulant de poulet après précipitation au sulfate d'ammonium à 50% de saturation. (colonne (1x 20cm), tampon d'éluion acétate (0,1 M, pH 5), gradient NaCl (0-0,5M), débit :54 ml/h, fraction :1,8 ml).

Bohak (1969) a conclu que la chromatographie sur DEAE-cellulose du pepsinogène 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 re chromatographie sur DEAE-cellulose fait apparaître que le matériel peptidique correspond au pic II à 0,28-0,30 M NaCl.

Paramètres Etapas de purification	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

Tableau 13 : Résultats des étapes de purification de la pepsine de poulet .

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 9) .

La filtration sur gel a permis d'obtenir , d'après le tableau 13 , un facteur de purification élevé de l'ordre de 20,57 , une activité spécifique également élevée (1,85 UP/mg prot.) 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.

Suite à des travaux de recherche portant sur la purification de la protéase de graines de melon et la pepsine ovine après précipitation au sulfate d'ammonium à 50% de saturation , Fernani (2003) et Slamani (2004) ont obtenu respectivement des rendements de l'ordre de 25% et 12 ,5 %. Morsli (1997) a noté, lors de la purification de l'extrait coagulant brut de poulet, un rendement en activité de l'ordre de 37,5 %. Cependant, Bohak (1969) a obtenu après chromatographie sur gel filtration du pepsinogène de poulet un rendement en activité assez élevé (61,64%) et une activité spécifique égale à $3,5 \times 10^3$ U /mg de prot.

Belhamiche (2005) a obtenu un rendement en activité de l'ordre de 10,03%, lors de la purification de la coagulase de *Mucor pusillus*, précipitée au sulfate d'ammonium à 80% de saturation.

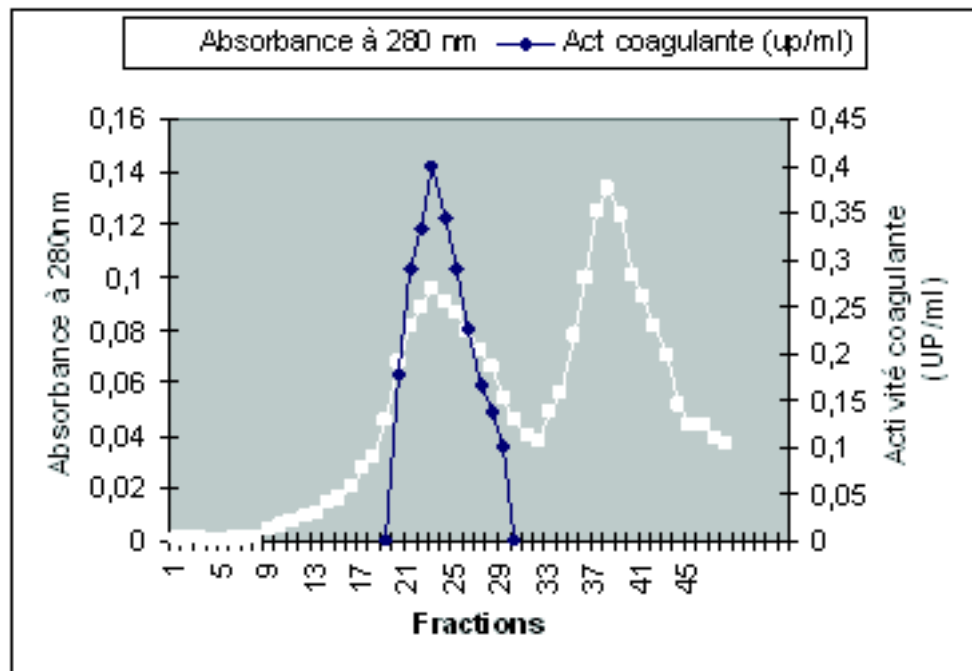


Figure 9 : Profil d'élution sur sephadex G-75 de la fraction active de poulet, issue de l'échangeuse d'anions (Colonne (1,5 x 30cm), tampon d'élution acétate (0,1 M ; pH5), débit : 14,4 ml/h, Fraction : 1,2 ml).

3- 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, dialyse et concentration avec du saccharose, 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 14).

Le profil de la chromatographie par échange d'anions sur DEAE-cellulose (A 52) , illustré par la figure 10, 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%.

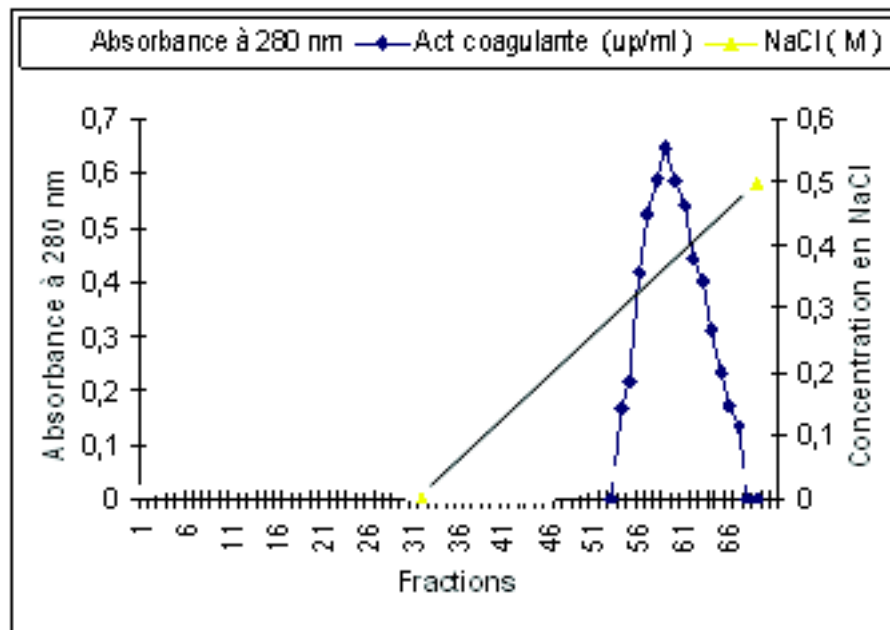


Figure 10 : Profil d'élution sur DEAE-cellulose (A52) de la pepsine de limon après précipitation au sulfate d'ammonium à 50 % de saturation .(Colonne (1 x 20 cm), tampon d'élution acétate (0,1M ; pH 5), gradient NaCl 0-0,5M, débit : 54ml/h, fraction : 1,8ml).

Paramètres Etapes de purification	Activité coagulante (UP)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UP /mg)	Rendement en activité (%)	Facteur de purification
EEB (limon)	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

Tableau 14 : Résultats des étapes de purification de la pepsine de limon .

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 11). 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 prot.) 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.

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 % .

Suite aux travaux de recherche portant sur la purification de la pepsine de poisson après précipitation au sulfate d'ammonium à 50 % de saturation, Maachou (2004) a obtenu un rendement en activité égale à 23%.

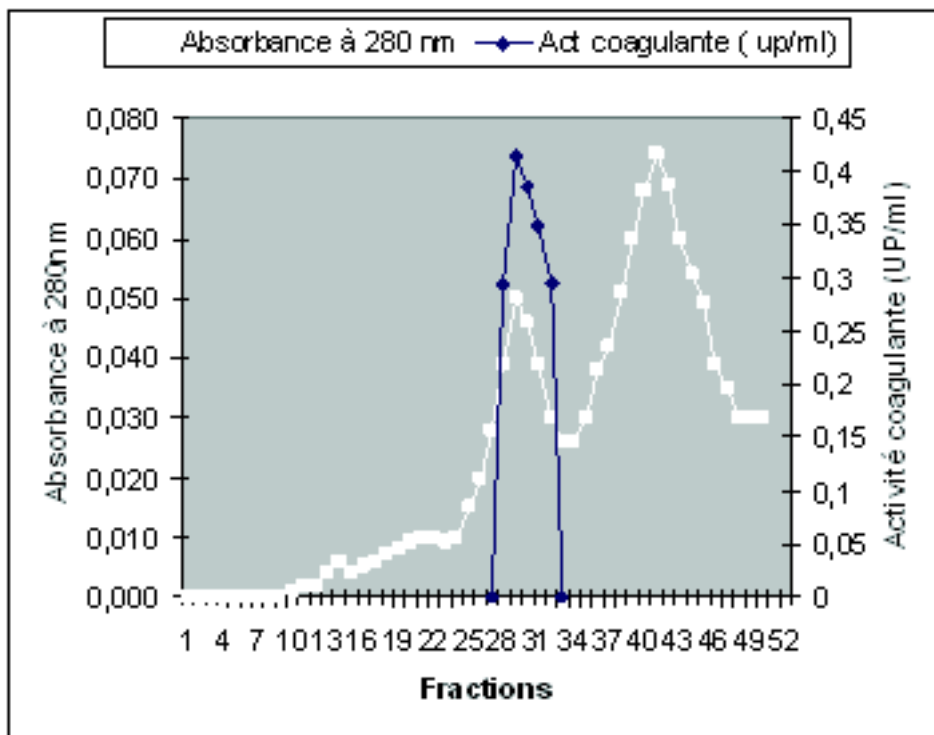


Figure 11 : Profil d'éluion sur sephadex G-75 de la fraction active de limon, issue de l'échangeuse d'anions .(Colonne (1,5x30 cm), tampon d'éluion : acétate (0,1M ; pH 5), débit : 14,4 ml/h, fraction : 1,2 ml).

III. 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 dépendant 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 1/545,45 pour l'extrait de limon).

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 20 fois. 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, quant à elle, est concentrée 25 fois. 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.

Il serait intéressant de compléter la purification par une technique plus fine : l'électrophorèse afin de mieux apprécier l'analyse des profils chromatographiques obtenus par gel filtration et d'estimer la masse moléculaire des enzymes étudiées. Bien que des études ont confirmé l'homogénéité des extraits de poulet et limon, dans notre recherche, des contraintes n'ont pas permis de mener à bien ces essais d'homogénéité.

IV. Caractérisation des extraits coagulants purifiés et de la présure

1- Activité coagulante comparée des extraits coagulants du poulet, de limon et de la présure en fonction de la température du lait.

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 12 indique un comportement légèrement différent des enzymes étudiées. En effet, l'optimum d'action pour la pepsine purifiée de poulet est obtenue à une température du lait égale à 40°C. Par contre, la pepsine purifiée de limon et la présure ont un optimum d'action à 45°C.

Nous constatons d'après cette figure que la pepsine de poulet et celle de limon sont complètement inactives à une température du lait égal à 55°C. Par contre, la présure devient inactive à 60°C.

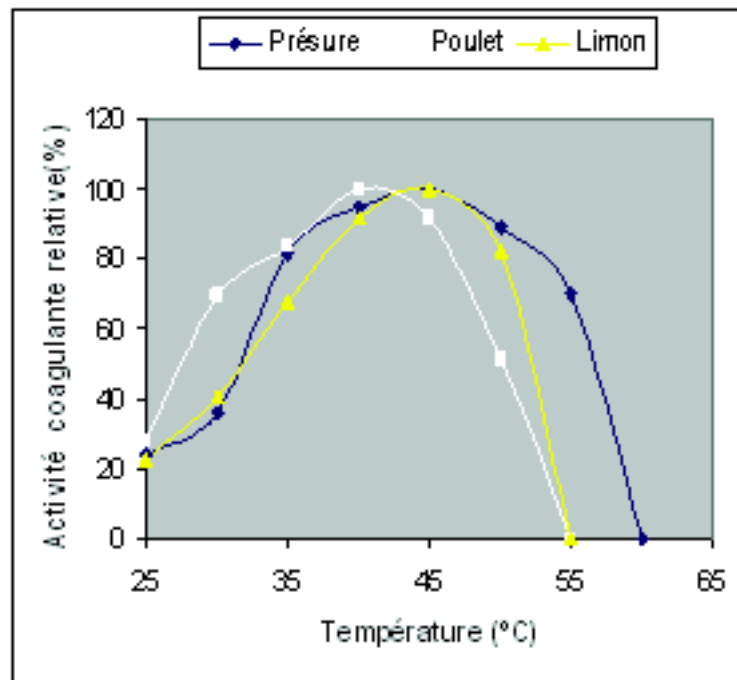


Figure 12 : Activité coagulante des deux extraits purifiés et de la présure en fonction de la température du lait .

Selon Garnot et Martin (1980), la présure présente une activité coagulante à une température voisine de 40 °C. Bengana (2001) a trouvé que l'optimum d'activité pour la chymosine et la pepsine bovine est à 45 °C.

Haard et al. (1982) ont signalé que la température optimale de coagulation pour la pepsine de poisson est de 30°C, celle pour la pepsine bovine et porcine se situe entre 30-50°C.

Morsli (1997) indique un optimum d'activité à 40 °C pour la pepsine purifiée de poulet. La pepsine purifiée d'ovin présente selon Slamani (2004) une température optimale d'action voisine de 52 °C. Maachou (2004) a noté un optimum d'action à 55°C pour la pepsine purifiée de limon et cette dernière serait inactive à 60°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. En effet, Morsli (1997) a noté que l'optimum d'action pour la cynarase de l'artichaut est à 60°C et celui de la ficine du latex de figuier est à 80°C. L'optimum d'activité coagulante pour l'extrait brut de fleurs de cardon est obtenu, selon Mouzali (2001), à une température du lait égale à 65°C. Fernani (2003) a indiqué que la température optimale de coagulation de la protéase purifiée des graines de melon est de 70°C.

Gourseaud (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.

Belhamiche (2005) a signalé que la température optimale d'action pour la coagulase purifiée de *Mucor pusillus* est obtenue a 50°C. Matoub (2000) a trouvé une température optimale d'action de 60°C pour la coagulase purifiée de *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33).

2- Activité coagulante comparée des pepsines de poulet et limon et de la présure en fonction du pH du lait

L'influence du pH du lait sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques est illustrée par la figure 13.

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. A 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.

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.

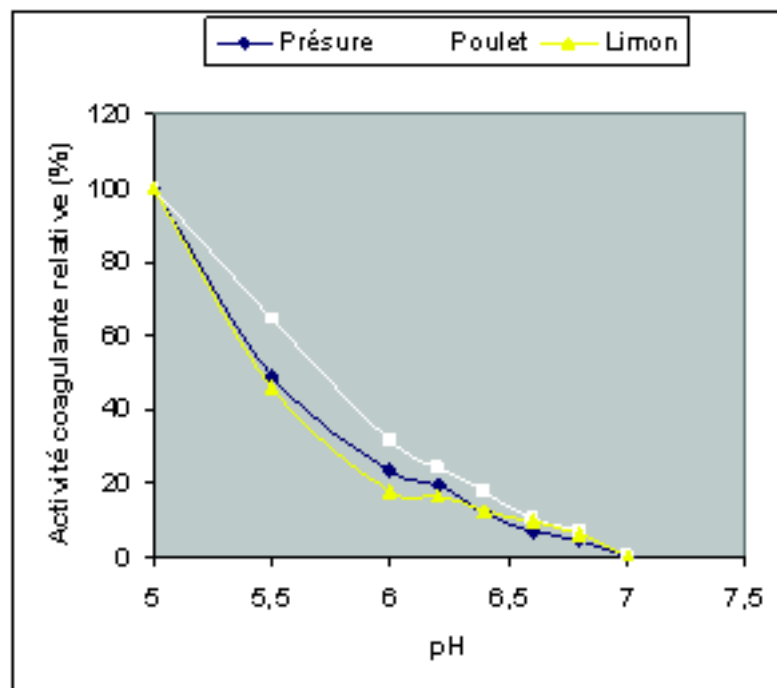


Figure 13 : Activité coagulante des deux extraits purifiés et de la présure en fonction du pH du lait.

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.

Maachou (2004) note un optimum d'activité au pH égale à 5,5 pour la pepsine purifiée de poisson. 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 de poisson chez *Munida*. Slamani (2004) a noté pour la pepsine purifiée d'ovin que le temps de coagulation est plus court lorsque le pH est abaissé au dessous du pH du lait (pH 6,6) et à pH supérieur à 6,7, l'enzyme commence à être inactivée.

Morsli (1997) a montré que la cynarase de l'artichaut et la ficine du latex de figuier présentent une bonne activité coagulante jusqu'à pH 6,6 par contre, Mouzali (2001) indique un pH optimum d'action égale à 5,2 pour l'extrait brut de cardon et Fernani (2003) a constaté une activité optimale au pH égale à 5,5 pour la protéase purifiée des graines de melon.

Matoub (200) note une activité coagulante optimale au pH 6,2 pour la coagulase de *Bacillus subtilis*(Lc33). L'optimum d'activité pour la protéase fongique *Mucor pusillus* a été obtenu, selon Belhamiche (2005), au pH égale à 5,0.

3- Activité coagulante comparée des pepsines du poulet, du limon et de la présure en fonction de la concentration du lait en CaCl_2

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 14 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 Brulé 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.

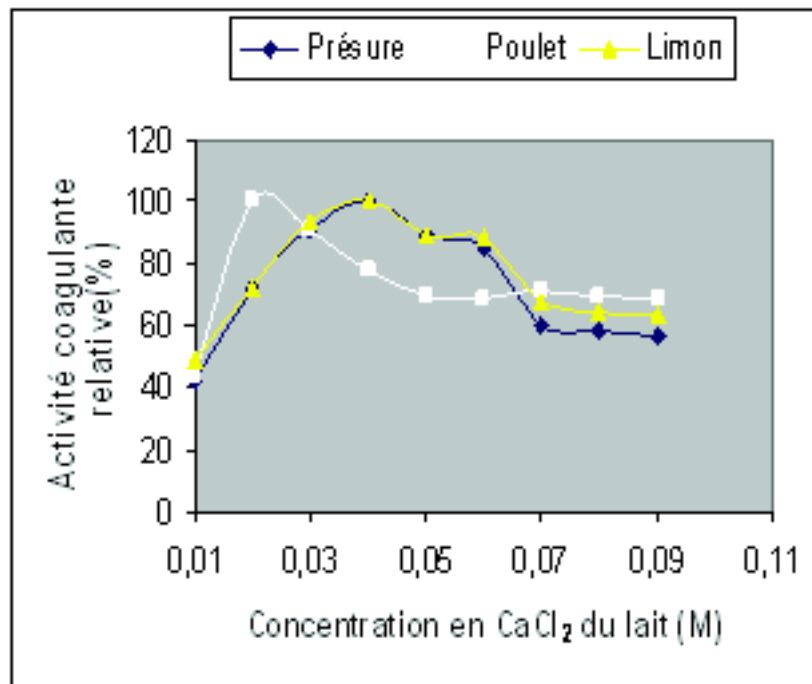


Figure 14 : Activité coagulante des deux extraits purifiés et de la présure en fonction de la concentration en CaCl_2 du lait

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, réduisant ainsi la stabilité micellaire (Eck, 1990).

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.

Morsli (1997) a indiqué une concentration optimale du lait en CaCl_2 de l'ordre de 0,023 M pour les préparations coagulantes végétales (artichaut et latex de figuier) et animale (poulet).

Mouzali (2001) a signalé que l'activité coagulante optimale pour la cynarase de cardon brute est obtenue à une concentration en CaCl_2 du lait égale à 0,025 M. Fernani (2003) a trouvé que l'optimum d'activité pour l'extrait coagulant purifié des graines de melon est obtenu à une concentration en CaCl_2 de l'ordre de 0,08M.

La pepsine de poisson présente, selon Maachou (2004), une activité coagulante optimale à une concentration en CaCl_2 de l'ordre de 0,05 M. Haard et al. (1982) ont signalé une concentration en CaCl_2 optimale de coagulation de l'ordre de 0,04 mM pour la pepsine de poisson, pour la pepsine bovine et porcine, elle se situe dans l'intervalle de 0.03-0.05Mm.

La pepsine ovine présente, selon Slamani (2004), une activité coagulante optimale à une concentration en CaCl_2 de 0,06 M.

4-Activité coagulante comparée des pepsines de poulet, limon et de la présure en fonction de la concentration en enzyme

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 15 indique que l'activité coagulante relative augmente quand la quantité d'extrait pour les trois préparations augmente. Cependant, dans l'intervalle de concentration choisi, on ne note pas de palier correspondant à une concentration saturante en enzyme.

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.

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.

Belhamiche (2005) a constaté un palier de saturation en enzyme et ce pour la coagulase purifiée de *Mucor pusillus* dans l'intervalle de concentrations allant de 0,25 à 0,3 mg/ml.

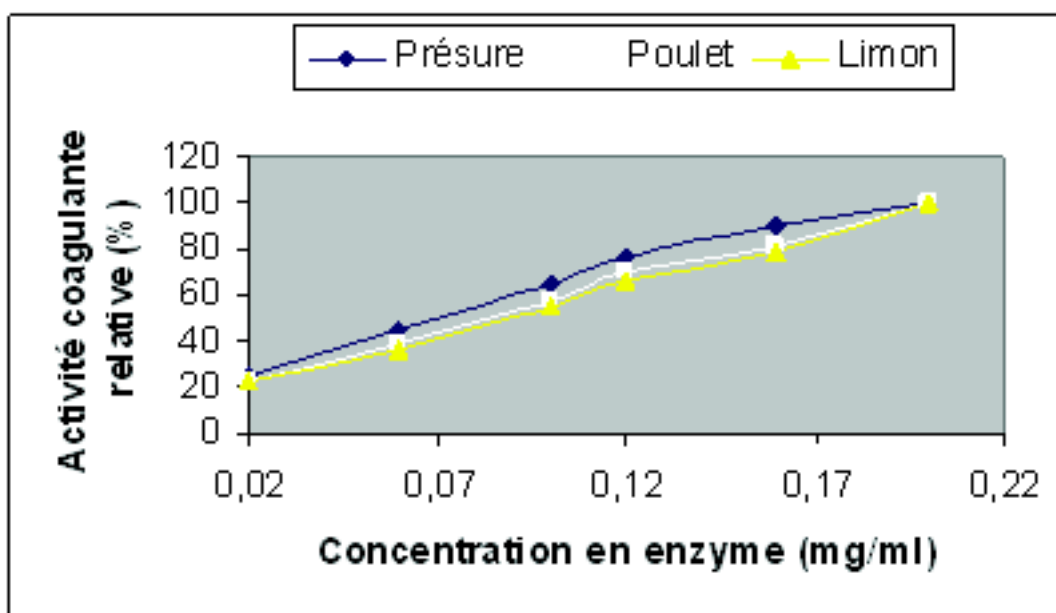


Figure 15 : Activité coagulante des deux extraits purifiés et de la présure en fonction de la concentration en enzyme.

5 - Etude de la stabilité des extraits coagulants purifiés et de la présure

5.1-la stabilité thermique

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 16, 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.

Maachou (2004) a montré que l'activité coagulante de la pepsine de limon est relativement stable dans l'intervalle de température compris entre 30 et 40 °C. Cependant, la pepsine ovine étudiée par Slamani (2004) est relativement stable pour des températures inférieures à 50 °C.

Les études menées sur les coagulases d'origine végétale et microbienne montrent une stabilité aux températures plus élevées que celle de la présure animale. En effet, Morsli (1997) a noté une grande stabilité thermique de la cynarase de l'artichaut et celle de la ficine du latex de figuier par comparaison avec celle d'origine animale (présure et poulet).

Mouzali (2001) indique une activité coagulante relativement stable dans l'intervalle de température compris entre 35 et 50 °C pour l'extrait brut de fleurs de cardon après 5 minutes d'exposition. Fernani (2003) en étudiant l'extrait coagulant des graines de melon a noté une stabilité thermique entre 30 et 55°C après 30 minutes d'exposition.

Matoub (2000) et Belhamiche (2005) ont indiqué une stabilité thermique dans l'intervalle de température compris entre 30 et 50 °C , respectivement , pour la coagulase produite par une souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33) et la coagulase produite à partir de la souche de *Mucor pusillus* .

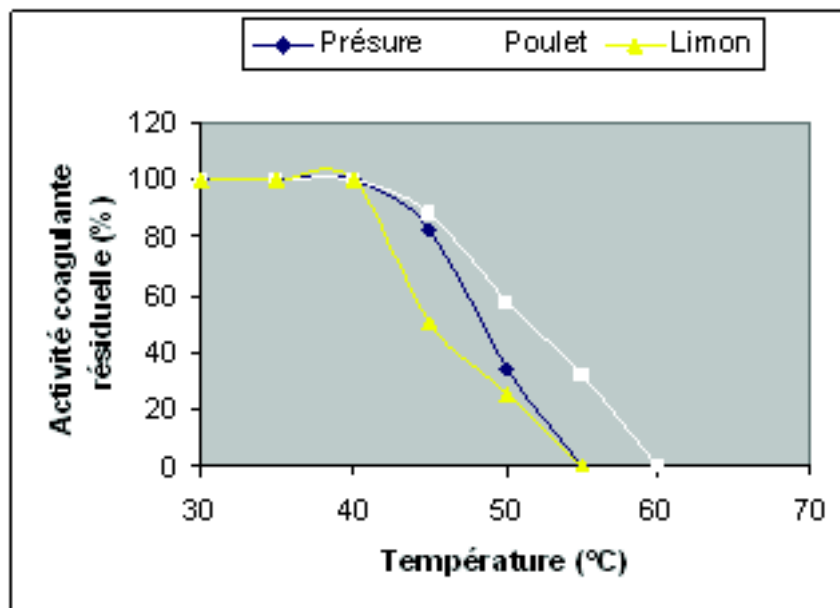


Figure 16 : Stabilité thermique des extraits purifiés et de la présure après 30 minutes d'incubation.

5.2- Etude de la stabilité au cours de la conservation à +4°C et -18°C des deux extraits purifiés poulet et limon

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 la figure 17 et 18 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 date, l'activité coagulante continue à baisser progressivement.

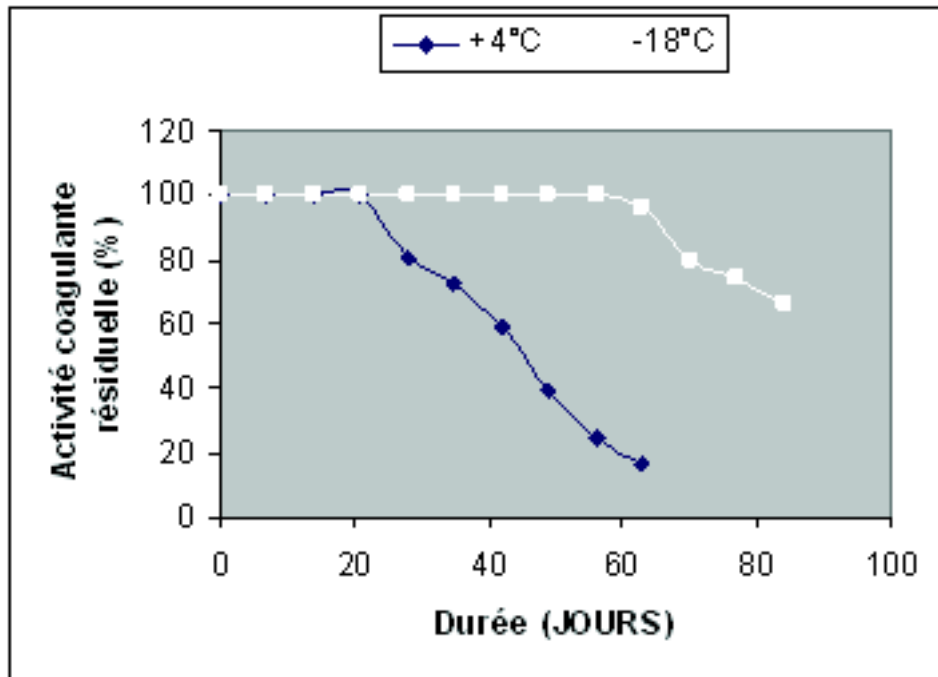


Figure 17 : Stabilité de l'extrait purifié de poulet en fonction du temps de conservation en congélation à - 18°C

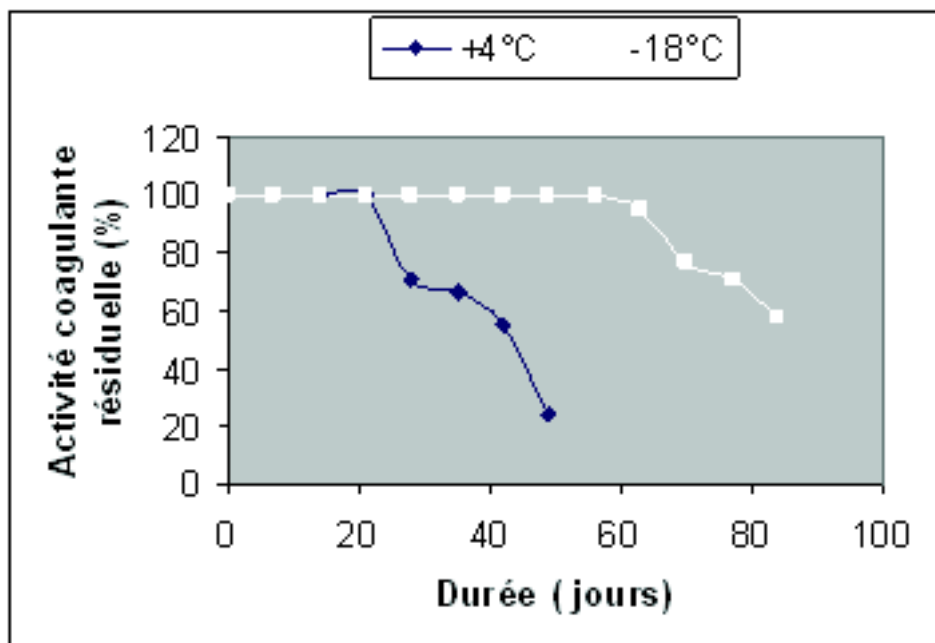


Figure 18 : Stabilité de l'extrait purifié de limon en fonction du temps de conservation en congélation à -18°C .

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 .

Morsli (1997) a montré une perte d'activité des coagulases purifiées du poulet , de l'artichaut, du figuier et de la présure , respectivement de 75% ,45%, 25% et 18 % lors d'une conservation à $+4^{\circ}\text{C}$ durant trois mois .La cynarase de l'artichaut , la ficine du latex de figuier, la pepsine de poulet (Morsli , 1997), la cynarase de cardon (Mouzali , 2001) et la protéase des graines de melon (Fernani ,2003) ont toutes montré une activité stable au cours des trois mois de stockage à -18°C .

Maachou (2004) a noté une baisse d'activité de 50 % le 45^{ème} jour de conservation à -18°C pour l'extrait coagulant de limon.

Matoub (2000) a signalé une activité résiduelle de 73 % au bout de 30 jours de conservation à $+4^{\circ}\text{C}$. Au delà, l'activité reste stable. Belhamiche (2005) a noté une baisse d'activité coagulante de l'extrait enzymatique purifié de la souche fongique *Mucor pusillus* au bout de 21 jour de conservation à $+4^{\circ}\text{C}$ avec une activité résiduelle de 82,21 % le 28^{ème} jour de stockage. Par ailleurs, ce même extrait reste stable au bout de 56 jours de conservation à -18°C .

6 - 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.

L'évolution de l'azote non protéique au cours de l'hydrolyse enzymatique a été rapportée par la figure 19 .Les résultats obtenus montrent que l'activité protéolytique de la présure est moins importante que celle des pepsines purifiées de poulet et limon.

En ce qui concerne, les deux pepsines purifiées, 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.

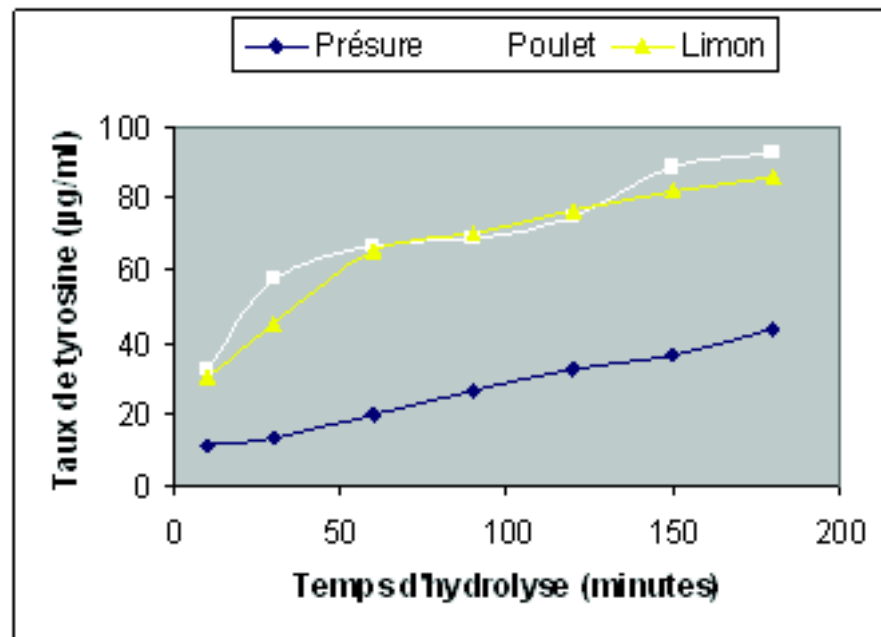


Figure 19 : Activité protéolytique des extraits purifiés et de la présure en fonction du temps de réaction .

V. CONCLUSION

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 0,01 à 0,02M de CaCl_2 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.

CONCLUSION GENERALE

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 CaCl₂ 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.

Étude comparative de deux protéases coagulant le lait, extraites de pro ventricules de poulet (*Gallus gallus*) et d'estomacs de limon (*Seriola sp.*)

- 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.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ait Amer Meziane L., 2004.** - Etude comparative de deux protéases coagulant le lait obtenues à partir du proventricule de poulet (*Gallus gallus*) et de l'estomac de poisson (*Seriola dumerili*). Mémoire Ing. agro. , Inst. Nat. agro. , El-Harrach, 65 p.
- Alais C., 1984.** - Sciences du lait – Principes des techniques laitières. Ed. SEPAIC, Paris, 4ème éd. , 814 p.
- Alais C. & Linden G., 1997.** - Biochimie alimentaire. Ed. Masson, Paris, 4ème éd., 248p.
- Andreeva N.S. & James M.N., 1991.** - Why does pepsin have a negative charge at very low pH ? An analysis of conserved charge residues in aspartic proteinases. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 306: 39-45.
- Anifantakis E.M. & 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.
- Areces L.B., Bonino M.B.I., Parry M.A.A., Fraile E.R., Fernandez H.M. & Cascone O., 1992.** - Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* , 37 : 283-294 .
- Arunchalam K. & Haard N.F., 1985.** - Isolation and characterization of pepsin from polar cod (*Boreogadus saida*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 80: 467- 473.
- Ball I.K., 2000.** - Caractérisation de la coagulase extraite du latex de figuier (*Ficus carica*).Mémoire Ing. Agro., Inst. Nati. agro., El-Harrach, 51 p.
- 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 : 339-346.
- Belhamiche N., 2005.** - Extraction, purification et caractérisation de la coagulase de *Mucor pusillus*. Mémoire Mag. Sces. agro., Inst. Nat. Agro., El-Harrach, 57 p.
- Bengana M., 2001.** - Caractérisation des enzymes protéolytiques (pepsine / chymosine) isolées à partir des caillottes de bovins adultes. Mémoire Mag. Sces. agro., Inst. Nati. agro., El – Harrach, 82 p.
- Berankova E., Rauck P., Kas J., Husek V. & Paluska E., 1987.** - Détermination indirecte de l'activité de coagulation du lait de la protéase de *Mucor miehei* présente dans les mélanges de présure. *J. of Dairy Sci.*, 54 (3): 407 – 413.
- Berridge N.J., 1945.** - The purification and crystallization of rennin. *Biochem.J.*, 39: 179-186
- Bohak Z., 1969.** - Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *The Journal of Biological Chemistry*, 244 (17): 4638 – 4648.

- 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: 38 – 43.
- Brulé 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.
- Brulé G., Lenoir J. & Remeuf F., 1997.**- La micelle de caséine et la coagulation du lait. In : Eck A. & Gillis J.C. (coord.). *Le fromage*. Ed. Tec. & Doc. , Lavoisier, Paris, 3^{ème} éd., pp. 7- 41.
- CEPIL, 1987.**- Le lait matière première de l'industrie laitière. INRA, Paris.
- Cerning J., Grippon J.C., & Desmazeaud M.J., 1984 .** - Utilisation des enzymes dans l'industrie laitière. *La Tech. Lait.* , 992 : 9 – 24.
- Chaplin M.F. & Bucke C., 1990.** - The large scale use of enzymes in solution. In :Chaplin M.F.& Bucke C. (Ed.).*Enzyme technology*. Cambridge Univ.Press, London,UK, pp.138– 166
- Cheeseman G., 1981.**- Présure et fabrication de fromage, enzyme and food processing. Applied publishers Ltd, London, 85 p.
- Chemlal R., 1998.** - Caractérisation et purification partielle de coagulases de *Bacillus subtilis* S3 et *Bacillus coagulans* LC23.2 .Mémoire Ing. Agro., Inst. Nati. Sces (Génie biol.), USTHB (Alger).
- Chen S., Agboola S. & Zhao J., 2003.** - Use of Australian cardoon extract in the manufacture of ovine milk cheese. A comparison with commercial rennet preparations. *Int. J. of Food Sci. and Technol.*, 38: 1–9.
- Collin J.C., 1981.**- Determination of chymosin and bovine pepsin A in commercial bovine rennets and pepsins. *Milchwissenschaft*, 36: 32-35.
- Collin J.C., Grappin R. & Pegract J., 1977.**- Etude de la méthode de mesure selon Berridge du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. *Le Lait*, 355 : 389-394.
- Cuvellier G.F., 1993.** - Production des enzymes. In: Scriban R. (coord.) . *Biotechnologie* . Ed. Tec. & Doc. , Lavoisier, Paris ,4^{ème} éd., pp. 351-364.
- Dalgleish D.G., 1982.** - Milk proteins, chemistry and physics. In: Fox P.F. & Condon J.J. (Ed.). *Food proteins*. Applied Sciences Publication, London, pp. 155-178.
- Dalgleish D.G., 1993.** - The enzymatic coagulation of milk. In: Fox P.F. (Ed.). *Cheese chemistry physic and microbial* (Vol I). Ed. Chapman & hall, London, 2^{ème} éd. , pp. 69-100.
- 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): 145-150.
- Dehove R.A., 1990.** - La réglementation des produits, qualité et répression des fraudes. Ed. Lamy, Fr., 13, pp. 550-569.

- Desmazeaud M.J., 1981.**- Principales utilisations des enzymes en industrielaitière:Aspects scientifiques et techniques. IAA : 195-204.
- Desmazeaud M.J., 1985.** - Les enzymes utilisées en industries laitières. In : Luquet F.M. (Ed.). Lait et produits laitiers : vache, brebis, chèvre. Ed. Tec. & Doc., Lavoisier, Paris, Tome II, pp. 582-603.
- De-Vecchi S.D. & Coppes Z., 1996.**- Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and south –West Atlantic region - a review. J. of Food Biochemistry, 20: 193-214.
- Eck A., 1990.** - Le fromage. Ed. Tec. & Doc., Lavoisier, Paris, 2^{ème} éd. , 539 p.
- Eck A. & Gillis J.C., 1997.**- Le fromage. Ed. Tec. & Doc. , Lavoisier, Paris, 3^{ème} éd.,
- Egas C., Lavoura N., Resendre R., Brito R.M.M., Pire E., de Lima & Faro C., 2000.** - The saposin-like domain of the plant aspartic proteinase precursor is a potent inducer of vesicle leak-age. J. Biol. Chem., 257: 38190-38196.
- El-Beltagy A.E. , El-Adawy T.A. , Rahma E.H. & El- Bedawey A.A., 2004.** - Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). Food Chemistry, 86, (1): 33-39.
- Emmons D.B., Reiser B., Giroux R.N. & Stanley D.W., 1976.** - Cheddar cheese made with bovine pepsin .1. Yield and quality of cheese. Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 10: 78
- Esteves C.L., Verissimo P.C., Faro C.J. & Pires E.V., 1995.** - Biochemical characterization of the vegetable rennets from the flowers of cardoon: comparison to calf rennet. J. Dairy Sci., 78: 145
- Esteves C.L.C., Lucey J.A. & Pires E.M.V., 2002.** - Rheological properties of milk gels made using coagulants of plants origin and chymosine. Int. Dairy J., 12: 427- 434.
- Faro C.J.F., 1991.** - Purification and physico-chemical characterization of *Cynara cardunculus L.* protease. Ph.D.Thesis, Univ. of Coimbra, Portugal.
- Faro C.J., Verissimo P., Esteves C. & Pires E.V., 1993.** - The biochemistry of cardoon rennet, a vegetal milk clotting enzyme traditionally used in Portugal for cheese making. Sheep Dairy News, 10: 25
- Faro C.J., Verissimo P.C., Lin Y., Tang J. & Pires E.V., 1995.** - In: Takahashi K. (Ed.). Aspartic proteinases: structure, function, biology and biomedical implications. New York Plenum Press, pp. 373-377.
- Faro C. , Ramalho-santos M. ,Vieira M. , Mendes A. , Simoes I. , Andrade R. , Verissimo P., Lin X.L. , Tang j. & Pires E., 1999.**- Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. J. Biol. Chem., 274: 28724- 28729.
- Federici F., 1982.**- Comparative study of some properties of a new milk coagulating enzyme and two commercial rennets .In: Dupuy P. (Ed.). Use of enzymes in food technology. Symposium International, Versailles, Paris, pp. 281-285.
- Fernani L., 2003.** - Obtention et caractérisation d'une protéase coagulant le lait à partir de graines de melon (*Cucumis melo L.*). Mémoire Mag. Sces agro. , Univ.M'Hamed Bouguerra, Boumerdes, 69p.

- Findlay C.I., Stanley D.W. & Emmons D.B., 1984.**- Chicken pepsin as rennet substitute. *Can. Int. Food Sci. Technol. J.*, 17(2): 97-101.
- Foltmann B., 1970.** - Prochymosin and chymosin. *Methods Enzymol.* , 19 : 421-436 .
- Foltmann B., 1981.**- Gastric proteinases. Structure, function, evolution and mechanism of action. *Essays Biochem.* , 17: 52-84.
- Foltmann B. , Drohse H.B. , Nielsen P.K. & James M.N., 1992.** - Separation of porcine pepsinogen A and progastricsin – Sequencing of the first 73 amino acid residues in progastricsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 112: 7582.
- Fontaine M., 1981.**- Nutrition des poissons. Actes du colloque CNERNA, Paris, 377p.
- Fox P., 1969.**- Milk clotting and proteolytic activities of bovine pepsin and porcine. *J. Dairy Res.*, 36: 427- 433.
- Garcia-Carreno F., 1991.**- Proteases in food technology. *Biotechnology Education*, 2: 150-153.
- Garcia-Carreno F., 1992 a.** - The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes, decapoda*): their partial characterization and the effect of feed on their composition. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 103: 575- 578.
- Garg S.K. & Johri B.N., 1994.** - Rennet: current trends and future research. *Food Reviews International*, 10, pp. 313-355.
- Garidi N. & Guessou H., 2006.** - Caractérisation d'une enzyme coagulase extraite à partir de graines de melon et son utilisation dans la fabrication d'un fromage frais. *Mémoire Ing. agro.* , Inst. Nati. Agro., El-Harrach, 50 p.
- Garnot P. & Martin P., 1980.** - Présure, composition, activité et son rôle en fromagerie. *Technique Laitière*, 930 (3) : 27- 30.
- Garnot P., Thapon J.L., Mathieu C.M., Maubois J.L. & Ribadeau-Dumas B., 1972.**- Determination of rennin and bovine pepsin in commercial rennets and abomasal juices. *J. Dairy Sci.*, 55: 1641
- Gas N., Noaillac-Depeyre J., 1981.** - Organisation, ultrastructure et fonction du tube digestif des téléostéens d'eau douce. In Fontaine M. Nutrition des poissons .Actes du colloque CNERNA, Paris, 377p.
- Gildberg A., 1988.** - Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 91 (3): 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: 323- 330.
- Gildberg A. & Raa J., 1983.** - Purification and characterization of pepsins from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 75 (3): 337- 342.
- Glick D., Auer H., Rich D., Kawai M. & Kamth A., 1986.** - Pepsinogen activation: Genesis of the binding site. *Biochem.* , 25: 1858
- Glick D., Shalitin Y. & Hilt C., 1989.** - Studies on the irreversible step of pepsinogen activation. *Biochem.* , 28: 2626
- Gordin S. & Rosenthal I., 1978.** - Efficacy of chicken pepsin as milk clotting enzyme. *J. Food Protection*, 41: 684

- Gourseaud J., 1993.** - Coagulation enzymatique du lait. In: Scriban R. (coord.). Biotechnologie . Ed. Tec. & Doc. , Lavoisier, Paris, 4^{ème} éd., pp. 393-405.
- Gourseaud J., 1999.** - Réacteurs traditionnels à enzymes libres : cas de l'industrie laitière. In : Scriban R. (coord.), Biotechnologies, 5^{ème} éd., pp. 365-401.
- Green M.L., 1972.** - Assessment of swine, bovine and chicken pepsins as rennet substitutes for Cheddar cheese making. J. of Dairy Res., 39: 261
- Green M.L., 1977.** - Review of the progress of dairy science: Milk coagulants. J. of Dairy Res., 44: 159- 188.
- Green M.L. & Stackpoole A., 1975.** - The preparation and assessment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase swine pepsin mixture for Cheddar cheese making. J. of Dairy Res., 42: 297- 312.
- Gu erard F., 1987.** - Une utilisation des enzymes protéolytiques extraites des viscères de poissons: La coagulation du lait. Rev. Trav. Inst.Pêches marit.49 (3et4): 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): 425- 435.
- 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.
- Haard N.F., 1986.** - Atlantic cod protease. Characterization with casein and milk substrate and influence of sepharose immobilization on salt activation, temperature characteristics and milk clotting reaction. J. of Food Sci., 51: 313- 316.
- Haard N.F., 1992.** - A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. J. of Aquatic Food Product Technology, 1 (1): 17-31.
- Haard N.F., 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.: 237- 241.
- Han X.Q., 1993.**- Recovery of digestive enzymes from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and their utilisation in food processing. MSc thesis, Dept. Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Canada.
- Heimgartner U., Pietrzak M., Geertsen R., Bordelius P., Silva-figueiredo A.C. & Pais M.S.S., 1990.**- Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. Photochemistry, 29: 1405- 1410.
- Honjo I., Kimura S. & Nonaka M., 1990.** - Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp *Penaeus indicus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 56 : 1627-1634.

- Ichihara Y., Sogawa K. & Takahashi K., 1985.** - Isolation of human, swine and rat pepsinogens and calf prechymosin, and determination of the primary structures of their NH terminal signal sequences. *J. Biochem.* , 98 : 483- 492.
- Jarrige R., 1989.** - Alimentation des bovines, ovins et caprins. J. Libbey Eurotext- Editions Medecine-Sciences, INRA, Fr., 471 p.
- Kageyama T., 2002.** - Pepsinogens, progastricsins and prochymosins: structure, function, evolution and development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 288-306.
- Kageyama T., Ichinose M., Tsukada-Kato S., Omata M., Narita Y., Moriyama A. & Yonezawa S., 2000.** - Molecular cloning of neonate / infant-specific pepsinogens from rat stomach mucosa and their expressional change during development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267: 806- 812.
- Kamoun P., 1998.** - Appareils et méthodes en biochimie. Ed. Flammarion medecine-sciences, Paris, 374p.
- Karlsen S., Hough E. & Olsen R.L., 1992.** - Structure and proposed amino acid sequence of a pepsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Acta Crystallographica D*, 54: 32- 46.
- Kim H., Pyeun J. & Cho J., 1986.** - Proteolytic enzymes distributed in tissues of dark fleshed fish. 2. Comparison of the proteolytic activity of the tissue extract from the internal organs of mackerel and sardine. *Bulletin of the Korean Fisheries Society*, 19: 521- 528.
- Kopelman I.J. & Cogan U., 1983.** - Etude de la thermostabilité de la pepsine au pH 3,4 et 6,6 ; cinétique de la dénaturation enzymatique. *J. of Dairy Sci.*, 66 (5): 981- 983.
- Kowalchuk A.W. & Olsen N.F., 1977.** - Effects of pH and temperature on the secondary phase of milk clotting by rennet. *J. of Dairy Sci.*, 60 (8): 1256- 1259.
- Larbier M. & Leclercq B., 1992.** - Nutrition et alimentation des volailles. Ed. INRA, Paris, 355p.
- Lenoir J., 1985.** - Coagulation du lait par la présure. *Revue Lait Française*, 440 : 434-440.
- Lenoir J., Lamberet G., Schmidt J.L. & Tourneur C., 1985.** - La maîtrise du bio réacteur fromage. *Bio futur*, Décembre : 23-50.
- Lopes A., Teixeira G., Liberato M.C., Pais M.S. & Clemente A., 1998.** - New vegetal sources for milk clotting enzymes. *J. Mol. Catal. B : Enzym.* , 5 : 63- 68.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J., 1951.** - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265- 275.
- Luquet F.M., 1985.**- Lait et produits laitiers : vache, brebis, chèvre. Tome II : Les produits laitiers – transformation et technologies. Ed. Tec. & Doc. , Lavoisier, Paris, 656 p.
- Maachou D., 2004.** - Extraction et purification de protéase coagulant le lait en vue de leur substitution à la présure traditionnelle : Essai d'obtention d'une protéase issue d'estomac de poisson (*Seriola dumerili*). Mémoire Mag. Sces agro. , Univ. M'Hamed Bouguerra (Boumerdes), 65p.

-
- Macedo I.M.Q., Faro C.J.F. & Pires E.M.V., 1993.** - Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine k-casein. *J. Agric. Food Chem.*, 41: 1537-1540.
- Mahaut M., Jeantet R. & Brulé G., 2000.** - Initiation à la technologie fromagère. Ed. Tec. & Doc., Lavoisier, Paris, 194 p.
- Mahon M.C. & Brown R.T., 1985.** - Chymosine, présure, protéases microbiennes et pepsine. Effet du type d'enzyme sur la coagulation du lait. *J. of Dairy Sci.*, 68(3):628-632.
- Martinez A. & Olsen R.L., 1989.** - Characterization of pepsins from cod. *US Biochem. Corp.*, 61: 22- 23.
- Martinez A. & Serra J.L., 1989.** - Proteolytic activities in the digestive tract of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Comp. Biochem. and Physiol. Part B*, 93: 61- 66.
- Matoub L., 2000.** - Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33). Mémoire de Mag. Sces agro, Inst.Nati.Agro., El-Harrach, 91 p.
- Mecedo A.C., Malcata F.X. & Oliveira J.C., 1993.** - The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *J. of Food Chemistry*, 76: 1725 - 1739.
- Mietton B., 1989.** - La standardisation du pH emprésurage des laits de fromagerie: nécessité et moyens .*Rev. des ENIL*, 133: 7- 16.
- Mietton B., 1991.** - Transformation du lait en fromage. In : de Roissart H. & Luquet F.M. (Coord.). *Les bactéries lactiques* (Vol. II). Ed. Loriga, Uriage, FR, pp. 55-133.
- Mietton B., Desmazeaud M., de Roissart H. & Weber F., 1994.** - Transformation du lait en fromage. In : de Roissart H. & Luquet F.M. (Coord.). *Les bactéries lactiques* (Vol.II).Ed. Loriga, Uriage, FR, pp. 55-133.
- Moll M. & Moll N., 1998.** - Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ed. Dunod, Paris, 218p.
- Morsli A., 1997.** - Recherche sur les activités protéasiques des extraits de *Cynara scolymus*, du latex de *Ficus carica* et du pro ventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Thèse Mag. sces agro., Inst.Nati.Agro., El-Harrach, 181p.
- Mouzali L., 2001.** -Extraction enzymatique et caractérisation de l'agent coagulant de la fleur de cardon sauvage (*Cynara cardunculus* L.). Mémoire Mag.Scès agro., Inst.Nati.Agro., El-Harrach, 84p.
- Nielsen P.K. & Foltmann B., 1995.** - Purification and characterization of porcine pepsinogen B and pepsin B. *Archiv.Biochem. Biophys.* , 322: 417- 422.
- Nguyen A.D. , Nungaray I. , Martel A. , Le Goffic F. , Moll D. & Leonil J., 1998.** - Purification and characterization of the main pepsinogen from shark (*Centroscyrnus coelolepis*). *J. of Biochem.* 124: 287- 293.
- 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): 27- 34.
-

- Nouani A. , Belkhodja R. , Maachou D. , Fernani L. & Bellal M.M., 2002.** - Recherche et caractérisation de quelques succédanés de présure en vue de leur utilisation dans la technologie fromagère. Premier Séminaire international sur la qualité et la sécurité dans le secteur agroalimentaire, Blida, 13 et 14 mai.
- 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.
- Öner N.D. & Akar B., 1993.** - Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilisation in Gaziateps cheese production. *Lebesem.Wiss.U-Technol.*, 26: 318-321 .
- Ounas F., 2004.** - Caractérisation d'une coagulase extraite du *Mucor pusillus* et son utilisation comme succédané de présure dans la fabrication d'un fromage type « Edam ».Mémoire Ing. Agro., Inst. Nati. Agro., El-Harrach, 69 p.
- Outaleb T., 2006.** - Aptitude à la coagulation du lait par la pepsine ovine. Mémoire Ing. Agro., Inst. Nati. Agro., El-Harrach, 50 p.
- Paez de Leon L., Pinzon G. & Otaiza Vasquez E., 1995.** - Purification and assay of chicken pepsin. *Acta Cient. Venez.*, 46 (4) : 237- 241.
- Pan B.S., Lan C.C. & Hang T.Y., 1991.** - Changes in composition and proteolytic enzymes activities of *Artemia* during early development .*Comp.Biochem. Physiol. Part A*, 100: 725-730.
- Pavlisko A., Rial A., De-Vecchi S.D. & Coppes Z., 1997.** - Properties of pepsin and trypsin isolated from the digestive tract of palometa (*Parona signata*). *J. of Food Biochem.*, 21: 289-308.
- 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.
- Phelan J.A., 1973.** - Laboratory and field tests on new milk coagulants. *Dairy Ind.*, 38: 218
- Pires E.M.V., 1998.** - Cardosine A cardosine B. In: Barrett A.J., Rawlings N.D. & Woessner J.F. (Ed.) .*Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, San Diego, CA*, pp. 843-846.
- Pires E. , Faro C. , Macedo I. , Esteves C. , Morgado J. , Verissimo P. , Pereira D. & Gomes D., 1994.** - Cardoon flower versus chymosin in the manufacture of traditional cheese. *Revista da Sociedade Portuguesa de Quimica*, 54 : 66- 68.
- Queiroz –Macedo I., Faro C.J. & Pires E.M., 1993.** - Specificity and kinetics of the milk clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus L.*) toward bovine #-casein. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1537- 1540.
- Ramalho-Santos M., Verissimo P., Faro C. & Pires E., 1996.** - Action on bovine #_{S1}-casein of cardosin A and B, aspartic proteinases from the flowers of the cardoon (*Cynara cardunculus*). *Biochimica Biophysica Acta*, 1297: 83- 89.
- Ramet J.P. & Hardy J., 1973.** - Les enzymes coagulantes en fromagerie. *Techniques du lait*, 4 : 7-14.

- Ramet J.P. & Weber F., 1980.** - Contribution à l'étude de l'influence des facteurs du milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le Lait*, 60 : 1-13.
- Ramet J.P., 1985.** - La fromagerie, les variétés de fromages du bassin méditerranéen. Etude FAO, Production et santé animale, Roma, Italia, N° 48, 187p.
- Ramet J.P., 1990.** - Les agents de transformation du lait. In: Eck A. (Coord.). Fromage. Ed. TEC. & Doc. , 2^{ème} éd., Lavoisier, Paris, pp. 101 –105.
- Ramet J.P., 1993.** - La technologie des fromages au lait de dromadaire (*Camelus dromadarius*). Etude FAO, production et santé animale, Roma, Italia, N°113.
- Reece P., 1988.**- Recovery of proteases from fish waste. *Process. Biochem.* , 6: 62-66.
- Richter C. , Tanaka T. & Yada R.Y., 1998.** - Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem. J.* , 335 : 481-490 .
- 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): 151-154.
- Ryle A.P., 1970.** - The porcine pepsins and pepsinogens. *Methods Enzymol.* , 19 : 316-336 .
- Sanchez-Chiang L., Cisternas E. & Ponce O., 1987.** - Partial purification of pepsins from adulte and juvenile salmon fish (*Oncorhynchus keta*). Effect of NaCl on proteolyticactivities. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87 (4): 793- 797.
- Schmidt D.G., 1980.** - Colloidal aspects of casein. *Neth. Milk Dairy J.*, 34: 42- 64.
- Scott R., 1979.** - “Rennets” and cheese. In: Wiseman (Ed.). Topics in enzyme and fermentation. *Biotechnology*, 3: 109- 155.
- Shahidi F. & Janak Kamil Y.V.A., 2001.** - Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 12 (12): 435-464.
- Shamsuzzaman K. & Haard N.F., 1983.** - Evaluation of harp seal gastric protease as arennet substitute for Cheddar cheese. *J. of Food Science*, 48: 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: 699- 708.
- Sielecki A.R., Fedorov A.A., Boodhoo A., Andreeva N.S. & James M.N., 1990.** - Molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8 Å° resolution. *J. Mol. Biol.* , 214: 143-170 .
- Silva S.V. & Malcata F.X., 2000.** - Action of cardosine A from *Cynara humilis* on ovine and caprine caseinates. *J. of Dairy Res.*, 67: 449- 454.
- Silva S.V. & Malcata F.X., 2005.** - Partial identification of water-soluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese like systems: Influence of type of coagulant and starter. *J. Dairy Sci.*, 88: 1947- 1954.
- Simões I.I.G., 1998.** - Molecular characterization of the activity of cardosins A and B on bovine #- and #-caseins. MSc. Thesis, Universidad de Coimbra, Portugal.

- Simpson B.K., 2000.** - Digestives proteinases from marine animals .In: Haard N.F. & Simpson B.K. (Ed.). Seafood enzymes. Marcel Dekker, Inc., New-York, pp. 191-213.
- Slamani R., 2004.** - Optimisation d'une méthode d'extraction de la pepsine ovine. Essai de purification et de caractérisation. Mémoire Mag. Sces agro., Inst. Nati. Agro., El-Harrach, 43p.
- Sousa M.J. & Malcata F.X., 1998.** - Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. Enzyme and Microbial Technology, 22: 305- 314.
- Squires J., Haard N.F. & Feltham L.A.W., 1986.** - Pepsin isosymes from Greenland cod (*Gadus ogac*) .1- purification and physical properties. Can. J. Biochem. Cell .Bio., 65: 205-209.
- Stanley D.W. & Emmons D.B., 1977.** - Cheddar cheese made with bovine pepsin. II – Texture, microstructure, composition, relationships .Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 10: 70
- Swaisgood H.E. , 1982.** - Chemistry of milk protein .In Developments in Dairy chemistry .I-Proteins: 1-60. Ed. P.F.Fox, London: Appl. Sci. Publish.
- Takahashi K. & Kageyama T., 1985.** - Multiplicity and intermediates of the activation mechanism of zymogens of gastric aspartic proteinases .In: Kosta (Ed.). Aspartic proteinases and their inhibitors. Ed. De Gruyter, Berlin, pp. 265-282.
- Tanaka T. & Yada R., 2001.** - N-terminal portion acts as an initiator of the inactivation of pepsin at neutral pH. Protein Engineering , 14 (9): 669-674.
- Tanji M., Kageyama T. & Takahashi K., 1988.** - Tuna pepsinogens and pepsins. Purification and characterization and amino terminal sequences. European Journal of Biochem. , 117: 251- 259.
- Trujillo A.J., Carretero C. & Guamis B., 1994.** - Rennets in the cheese industry. Alimentacion Equipos y Tecnologia, 13 : 91-97.
- Tsouli J., 1979.** - Etude d'une protéase coagulante extraite de *Cynara scolymus* et de *Cynara cardunculus*, adaptation de la méthode conductimétrique pour la détermination du temps de coagulation du lait et le contrôle des fabrications. Doctorat es-sci, Univ. C. Bernard, Lyon,
- Twining S.S., Alexander P.A. & Glick D.M., 1983.** - A pepsinogen from rainbow trout. Comp. Biochem. And Physiol., 75: 109- 112.
- Valles E., Vassal L. & Ribadeau-Dumas B., 1977.** - Utilisation d'une préparation de pepsine bovine dans la fabrication des fromages à pâte molle, à pâte pressée et à pâte cuite. Revue Laitière Française, 350 : 87-99.
- Van Hooydonk A.C.M., Boerrigter I.J. & Hagedoon H.G., 1986 b.** - pH induced physicochemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 2- Effect of pH on renneting of milk. Neth. Milk Dairy J., 40: 297- 313.
- Veisseyre R., 1975.** - Technologie du lait. Constitution, récolte, traitement et transformation du lait. Ed. La maison rustique, 3^{ème} éd., Paris, 714p.
- Veisseyre R., 1978.** - Technique laitière. Ed. La maison rustique, 4^{ème} éd., Paris,

-
- Venugopal V., 1995.** - By-products from industrial fishery processing. *Indian Food Industry*, 14: 22- 24.
- Verissimo P. , Faro C.J.C. , Moir A.J.C. , Yingzhang L. , Tang J. & Pires E., 1996.** - Purification and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteases from fresh flowers of *Cynara cardunculus L.* *European Journal of Biochemistry*, 235: 762-768.
- Vieira M., Pissara J., Verissimo P., Castanheira P., Costa Y., Pires E. & Faro C., 2001.** - Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus L.* *Plant Mol. Biol.*, 45: 529-539
- Vieira de Sà F. & Barbosa M., 1972.** - Cheese making with vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus*). *J. Dairy Res.*, 39: 335-343.
- Walstra P. , Geurts T.J. , Noomen A. , Jellema A. & Van boekel M.A.J.S., 1999.** - Dairy Technology: principles of milk properties and processes.
- Wigley R.C., 1996.** - Cheese and whey in industrial enzymology. Ed. Godfrey and Wiest, 2^{ème} èd., pp. 135-142.
- Withney R., Brunner J.R., Ebner K.E., Farrell H.M., Josephoon R.V., Moor C.V. & Swaigsgood H.E., 1976.** - Nomenclature of the proteins in cow's milk. *Dairy*, 59: 795-815.
- Xu R.A., Wong R.J., Rogers M.L. & Fletcher G.C., 1996.** - Purification and characterization of acid proteases from the stomach of the deepwater finfish orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*). *J. of Food Biochem.* , 20: 31- 48.

ANNEXES

ANNEXE 01

PREPARATION DES SOLUTIONS TAMPONS (KAMOUN, 1998)

1-Solution tampon citrate à 0,1M :

Solution A : citrate disodique 0,1M :

21,01 g /l ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ + 200ml NaOH)

Solution B : HCl 0,1N

Pour avoir une solution tampon à pH = 5, mélanger :

30,2ml de A + (100 – 30,2)ml de B .

2-Solution tampon acétate à 0,1M :

Solution A : Acétate sodique 0,1N :

8,204g/l ($C_2H_3O_2 Na$) Ou 13,61g/l ($C_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$)

Solution B: Acide acétique 0,1N :

6,005g/l (CH_3COOH)

Pour avoir une solution tampon à pH = 5, mélanger :

67,8ml de A + (100 – 67,8)ml de B .

3-Solution tampon phosphate 1/15M :

Solution A : Phosphate mono potassique 1/15 M

9,073g/l ($K H_2 PO_4$)

Solution B: Phosphate disodique 1/15 M

11,87g/l ($Na_2 HPO_4 \cdot 2H_2O$)

Pour avoir une solution tampon à pH=5 mélanger :

99,2 ml de A + (100-99,2) ml de B.

ANNEXE 02

DETERMINATION DE LA TENEUR EN MATIERES AZOTEES TOTALES (M.A.T) (KJELDAHL)

1. Mode opératoire :

L'opération s'effectue sur une prise d'essai d'un gramme de l'échantillon . Cette quantité est introduite dans un matras de 250 ml en présence de 2g de catalyseur et de 20ml

d'acide sulfurique pur. Le matras est porté sur le support d'attaque. Le chauffage est poursuivi jusqu'à décoloration du liquide et obtention d'une coloration verte stable. Après refroidissement on ajoute l'eau distillée avec précaution jusqu'à obtention d'un volume de 250 ml.

Après la minéralisation, on passe à la distillation qui consiste à mettre dans un bêcher destiné à recueillir le distillat 20 ml d'indicateur coloré. On verse lentement 10ml du contenu du matras dans le ballon de l'appareil distillateur, on lui ajoute 50ml de lessive de soude. On met l'appareil en position de marche et on laisse l'attaque se faire jusqu'à obtention d'un volume de distillation de 100ml. Le contenu du bêcher est titré par l'acide sulfurique N/50 jusqu'à ré obtention de la couleur initiale de l'indicateur.

La teneur en matières azotées totales est obtenue par la formule :

$$\% \text{ MAT} = \text{N}(\%) \times 6,25$$

$$\frac{(\%) \text{ N}}{\text{A MS}} = \text{D} \cdot 280 \cdot 10^{-6} \times \frac{100}{X} \times \frac{250}{Y} \times \frac{100}{Z} \quad (\text{JARRIGE, 1989})$$

Avec :

N : Pourcentage d'azote obtenu .

D : Descente de burette en (ml) .

Y : Poids de l'échantillon de départ .

A : Volume de la prise d'essai .

MS : Pourcentage de la matière sèche de l'échantillon.

ANNEXE 03

DOSAGE DES PROTEINES TOTALES (LOWRY et al. ,1951).

Le dosage des protéines totales dans les solutions enzymatiques est effectué par la méthode de LOWRY. C'est une méthode colorimétrique par référence à une courbe étalon établie à partir d'une solution standard de sérum albumine bovine (B.S.A) . La densité optique est mesurée au spectrophotomètre à 750nm.

1.Réactifs :

Solution (A) : Solution de Na_2CO_3 anhydre à 2% (P/V) dans NaOH 0.1N.

Solution (B): 2ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ à 0.5% + 2ml de tartrate de Na et K à 1%

Solution (C) : 50 ml de A + 1 ml de B .

Solution (D) : Réactifs de Folin-Ciocalteu dilué au $\frac{1}{2}$.

2.Mode opératoire :

A 1 ml de solution enzymatique diluée, on ajoute 5ml de la solution (C).Après un temps de repos de 10 minutes à température ambiante, on ajoute 0.5ml de la solution (D) au mélange réactionnel. Après une rapide agitation, on laisse incuber pendant 30 minutes à l'obscurité.

Une coloration bleue apparaît correspondant à la réaction du cuivre par l'acide phosphomolybdique. La lecture de la densité optique se fait au spectrophotomètre à 750nm.

La concentration en protéine (mg/ml) est déterminée par référence à une courbe étalon établie à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (B.S.A) à 200µg/ml.

3.Courbe d'étalonnage :

Solution étalon : B.S.A à raison de 200µg/ml dans de l'eau distillée .

Gamme étalon : des solutions diluées de concentrations croissantes :25 , 50 , 75, 100 ,150 et 200 µg/ml sont préparées à partir de la solution étalon .

Lecture :La lecture des densités optiques est faite au spectrophotomètre à 750nm contre un blanc contenant 1ml d'eau distillée.

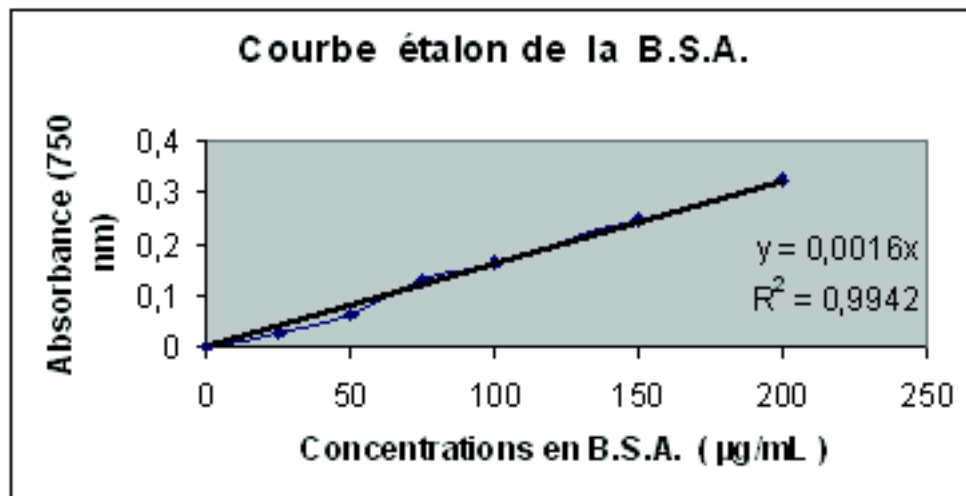


Figure 1 : Courbe étalon de BSA

ANNEXE 04

MESURE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE (GREEN et STACKPOOLE,

1-Mode opératoire:

Condition d'hydrolyse

1ml de la solution de caséine à 2% dans le tampon acétate (0.1N ; pH 5) est additionné à 1ml d'extrait enzymatique dilué. Le mélange réactionnel ainsi préparé est incubé pendant 10 ,30 ,60 ,90 ,120 ,150 ,180 minutes à 35°C.

Après incubation , la réaction enzymatique est arrêtée par addition de 5ml de solution trichloracétique(T.C.A) à 12% (P/V). Après 15 minutes de repos , il se forme un précipité blanc que l'on sépare par centrifugation à 6200g/10 mn

Préparation de l'échantillon

A 1 ml de filtrat (surnageant obtenu) sont additionnés 5 ml de la solution C.On mélange puis on laisse incuber pendant 10 minutes dans le bain marie à 35 °C.Dans chaque tube , on ajoute 0.5 ml de de réactif Folin –ciocalteu et on agite immédiatement . on continue l' incubation pendant 20 minutes .

Préparation du témoin (blanc)

A 1 ml de la solution caséinique à 2% sont additionnés 5ml de T.C.A à 12% (pour empêcher la réaction enzymatique) puis 1 ml d'extrait enzymatique dilué. Le mélange ainsi préparé est traité de la même façon que précédemment.

2. Courbe étalon de tyrosine :

Solution étalon : Tyrosine raison de 100 μ g/ml dans une solution tampon acétate(0.1N ; pH=5)

Gamme étalon : Des solutions diluées de concentrations croissantes : 10,20,40,60,80, 100 μ g/ml sont préparées à partir de la solution étalon.

Dosage : Méthode de LOWRY (annexe :4).

Lecture : Elle s'effectue au spectrophotomètre à 660nm contre un blanc contenant 1ml d'eau distillée.

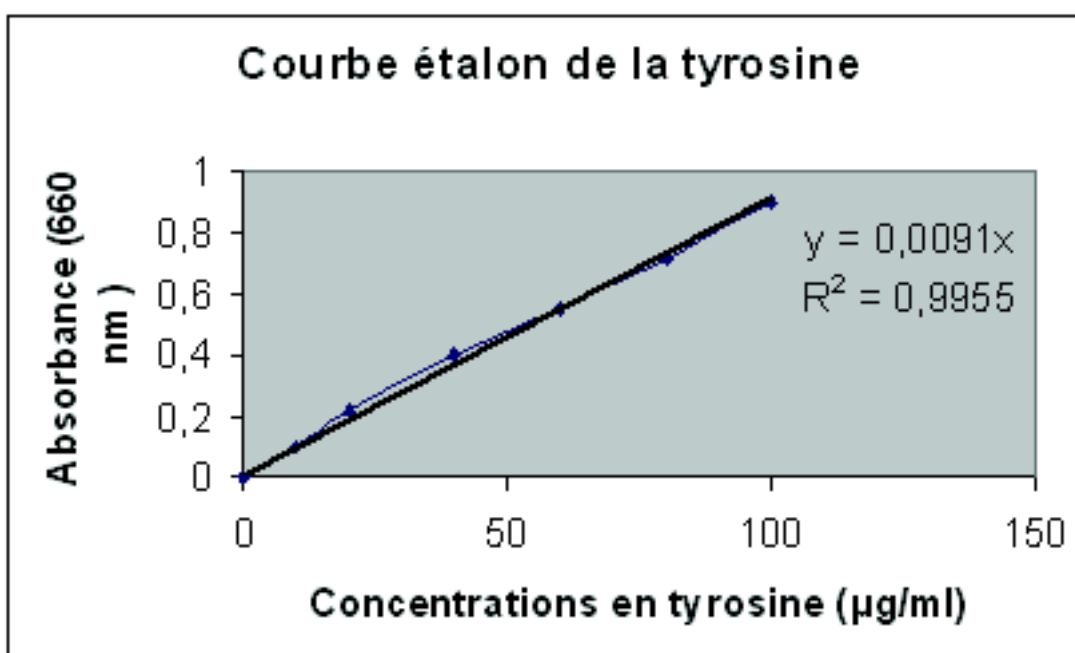


Figure 1 : Courbe étalon de tyrosine