

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



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Sciences Alimentaires**

**Filière : Sciences Alimentaires**

**Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire**

**Mémoire de Fin de Cycle**  
**en vue de l'obtention du diplôme**

**MASTER**

**Recherche de succédané de la présure d'origine animal et végétal**

Présenté par :

**SIDHOUM Dounia & SAIDI Nourelhouda**

Devant le jury composé de :

**Mr Boukhalfa Farid**  
**Mme Guemghar Hayat**  
**Mme Boulekbache Lila**

**MCA**  
**Professeur**  
**Professeur**

**Encadreur**  
**Examinatrice**  
**Président**

**Année universitaire: 2022 / 2023**

# Remerciements

*Tout d'abord, nous tenons à remercier le bon Dieu, qui a guidé nos pas et nous a donné la force et le courage nécessaires pour mener à bien ce travail.*

*Nous tenons à exprimer notre gratitude et profonde reconnaissance envers notre promoteur Docteur Boukhalifa Farid, pour avoir accepté de nous encadrer, pour ses conseils, ses orientations ainsi que pour son expertise, sa disponibilité et son encadrement précieux qui' ont été essentiels pour mener à bien ce travail. Pour la confiance qu'il nous a faite tout au long de la réalisation de ce travail, merci cher promoteur*

*Nous adressons également nos sincères remerciements et reconnaissance aux membres du jury, professeur Boulekhabche. L et professeur Guemghar .H ., qui nous ont fait l'honneur d'examiner et d'évaluer notre mémoire.*

*Je remercie également l'ingénieur de laboratoire de technologie alimentaire Mme DIB Salima, pour son aide précieuse.*

*Un grand merci à Mr Allout Nadir, Directeur du laboratoire recherche et développement (LRD) de la Laiterie SOUMMAM, pour son soutien et tous ses conseils scientifiques, pour toutes les aides dans la réalisation de ce travail. Nous remercions également son équipe, pour leur aide précieuse et leur disponibilité.*

*Que tous les participants des séances d'évaluation sensorielle descriptive trouvent ici, l'expression de ma sincère gratitude pour leur disponibilité et leur application.*

*Enfin, nous voulons adresser nos remerciements à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*



## *Dédicace*

*Je dédie ce travail de recherche À ;*

*Vous mes parents, vous êtes les véritables guides de ma vie, ceux qui m'ont transmis des valeurs solides et m'ont toujours encouragé à poursuivre mes rêves. Votre soutien indéfectible m'a permis de croire en moi-même et de me dépasser à chaque étape de ce mémoire.*

*Mon frère Amine, ta présence bienveillante et ton soutien constant ont été essentiels pour moi.*

*Ma cousine Amel, tu as été mon pilier tout au long de ce mémoire.*

*Ma chère tante Saida et à toutes mes autres tantes.*

*Mes chers oncles : Zizi Md Akli, Dada Mouhamed, Dada Belkacem et Amti Saida*

*Ma grand-mère et à toute la famille Sidhoum et Sorba, vous êtes mes racines, ma source d'inspiration. Votre amour et vos prières ont été une force puissante tout au long de ce mémoire.*

*Mes amies Sabrina Abid et Sihem Minouchi.*

***Dounia***

## *Dédicace*

*Je dédie humblement ce travail à vous tous, qui êtes les piliers de ma vie. Votre amour inconditionnel, votre soutien constant et votre présence bienveillante ont été des éléments essentiels dans mon parcours.*

*À mes chers parents, vous êtes mes premiers modèles de force et de détermination.*

*À ma sœur Nihad, mon amie et ma complice. Tu m'as toujours soutenu et inspiré avec ta gentillesse et ton intelligence. Je te dédie ce travail en témoignage de notre lien indestructible et de notre soutien mutuel.*

*À mes deux frères Nazim et Siffdine, vous êtes mes compagnons de vie, mes alliés et mes amis.*

*À mes grands-parents Mouhand et Fatma*

*À mon cher fiancé Nabil, ta présence aimante et ton soutien sans faille ont été une source d'inspiration constante. Tu m'as encouragé à croire en mes capacités et à poursuivre mes rêves. Cette dédicace est un témoignage de mon amour pour toi et de ma gratitude pour ton soutien sans relâche.*

*À mes chers oncles Mouhand et Nouredine, mes guides et mes conseillers. Votre sagesse, votre expérience et votre soutien précieux ont été des atouts inestimables dans ma vie. Je vous remercie pour votre soutien indéfectible.*

*Et enfin, à ma chère tante Samira,*

*Nour ElHouda*

## *Abréviations*

**AC** : Activité coagulante

**AP** : Activité protéolytique

**°C** : Degré Celsius

**Djben** : Fromage traditionnel algérien à base de lait de chèvre

**ES** : Extrait sec

**Feta** : Fromage grec traditionnel

**KDa** : Kilo dalton

**MG** : Matière grasse

**NSLAB**: Non Starter Lactic Acid Bacteria

**pH** : Potentiel hydrogène

***P. roqueforti*** : *Penicillium roqueforti*

**TCA** : Acide Trichloracétique

**SAB** : Sérum Albumine Bovine

**UP** : Unité Présure

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Modèle de micelle de caséine avec sous-unités (Amiot et al., 2002) .....	5
<b>Figure 02</b> : Hydrolyse de la caséine $\kappa$ par la présure, (Fox et al., 1994) .....	7
<b>Figure 03</b> : Photographie des échantillons de fromage élaborés .....	17
<b>Figure 04</b> : Photographie des échantillons de fromage frais obtenu .....	18
<b>Figure 05</b> : L'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante .....	22
<b>Figure 06</b> : L'effet du $\text{CaCl}_2$ sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés ....	23
<b>Figure 07</b> : Représentation graphique de l'influence du pH sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés .....	25
<b>Figure 08</b> : Représentation graphique de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés .....	27
<b>Figure 09</b> : Résultats de l'évaluation de la couleur par les dégustateurs des fromages élaborés .....	28
<b>Figure 10</b> : Résultats de l'appréciation de la couleur par les dégustateurs des fromages élaborés .....	29
<b>Figure 11</b> : Résultats de l'évaluation de l'odorat par les dégustateurs des fromages élaborés .....	30
<b>Figure 12</b> : Résultats de l'évaluation de la texture par les dégustateurs des fromages élaborés .....	30
<b>Figure 13</b> : Résultats de l'appréciation de l'aspect par les dégustateurs des fromages élaborés .....	31
<b>Figure 14</b> : Résultats de l'évaluation de la préférence des fromages élaborés .....	31

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Composition générale du lait en g/100mL (Amiot et <i>al.</i> , 2002) .....	<b>3</b>
<b>Tableau II</b> : Caractéristiques physicochimiques des extraits enzymatiques de chinchard et chardon laiteux .....	<b>19</b>
<b>Tableau III</b> : Tableau représente le rendement de fromage chinchard et de chardon laiteux .....	<b>2</b>

# Sommaire

*Remerciement*

*Liste des abréviations.*

*Liste des figures.*

*Liste des tableaux.*

**Introduction.....1**

## Partie bibliographique

**I- Généralités sur le lait .....3**

**I-1 Composition chimique du lait .....3**

**I-2 Micelles de caséine.....5**

**I-3 Coagulation du lait .....6**

**I-3.1 Coagulation par voie acide .....6**

**I-3.2 Coagulation mixte.....6**

**I-3.3 Coagulation par voie enzymatique .....6**

**I-4 Enzymes coagulants du lait .....8**

**I-5 Succédanés de la présure .....9**

**I-5.1 Succédanés de la présure d'origine animale .....9**

**I-5.2 Succédanés de la présure d'origine végétale .....10**

**I-5.3 Succédanés de la présure d'origine microbienne .....10**

## Matériels et méthodes

**I-Matériel et méthodes .....11**

**I.1 Matériel végétal et animal.....11**

**I.2. Préparation des extraits enzymatiques .....11**

**I.2.1. Procèdes d'extraction de l'enzyme végétale .....11**

**I.2.2.Procèdes d'extraction de l'enzyme animale.....12**

**I-3 Caractérisation physico-chimique de l'extrait brut .....12**

**I-4 Mesure des activités enzymatiques .....13**

**I-4.1 Activité enzymatique .....13**

**I-4.2 Activité protéolytique.....13**



I-5 Evaluation de l'activité coagulante .....	14
I.6 Étude des paramètres influençant l'activité enzymatique .....	15
I.6.1.Effet de la température sur l'activité coagulante.....	15
I.6.2.Effet du potentiel hydrogène sur l'activité coagulante.....	15
I.6.3. Effet de la concentration en chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> ) sur l'activité coagulante .....	16
I.6.4. Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante .....	16
I.7.Elaboration d'un fromage frais .....	16
I-8 Rendement fromager.....	18
I.9 Analyse sensorielle des fromages.....	18

## Résultats et discussions

I- Caractérisation physico-chimique des extraits enzymatiques étudiés.....	19
II- Détermination des conditions optimales de coagulation des extraits enzymatiques étudiés .....	22
II-1 Effet de la concentration de la concentration d'enzyme sur l'activité coagulante ..	23
II-2 Effet de la concentration de Cacl <sub>2</sub> sur l'activité coagulante.....	23
II-3 Effet de du potentiel d'hydrogène sur l'activité coagulante .....	25
II-4 Effet de la température sur l'activité coagulante.....	26
III- Analyses sensorielle .....	28
Conclusion.....	29

### *Références bibliographiques*

### *Annexes*



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

La transformation du lait en fromage nécessite la coagulation des caséines qui va permettre de passer de l'état liquide à l'état de gel. La coagulation du lait est définie comme la déstabilisation des micelles de caséine, qui flocculent et s'agrègent pour former un gel renfermant les composants solubles du lait. Plusieurs techniques de coagulation peuvent être employées (**Troch et al, 2017**).

La présure de veau est l'agent coagulant le plus utilisé pour la coagulation du lait. Cette préparation enzymatique est extraite des caillettes de jeunes veaux non sevrés qui comprend la chymosine, enzyme majoritaire, et la pepsine (**Desmazeaud, 1997**).

L'augmentation de la production de fromage nécessite une plus grande utilisation de la coagulase, qui ne peut être obtenue par le traitement à la présure seul en raison des rendements irréguliers chez les veaux de lait.

L'extraction de la présure exigerait des sacrifices très coûteux. En effet, elle nécessite la récupération de la caquette des veaux non sevrés après abattage, ce qui impacte fortement les coûts du fait des faibles rendements en viande (**BELHAMICHE,(2005)**). Ce qui provoque une situation de pénurie de présure <sup>2</sup>(**Seker et al., 1999**).

Cette situation est causée par des communautés religieuses qui s'opposent à l'abatage des jeunes ruminants qui a stimulé la recherche de succédanés de présure convenables. Ainsi, de nombreuses protéases d'origine végétale, microbienne et animale ont été étudiées.

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

En Algérie, plusieurs préparations traditionnelles de fromages régionaux tels qu'Aghoughlou, Djben et Kemaria sont réalisées en utilisant des plantes, particulièrement des fleurs de chardons et de figuier (**Androuët, 2002**).

L'objectif de notre recherche est de valoriser une pratique ancestrale en valorisant un succédané à base de poisson (chinchard) et de chardon laiteux. Pour atteindre cet objectif, nous avons structuré notre travail de recherche en deux parties distinctes. La première partie se concentre sur l'étude bibliographique. Quant à la seconde sera dédiée à la mise en pratique. Elle est divisée en deux sections principales : le matériel et méthodes, la discussion et les résultats.

Nous concluons notre recherche par une synthèse générale qui résumera les principales notre étude.

## I- Généralités sur le lait

Le lait a été défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne comportant pas de colostrum » (Mekhaneg, 2020).

C'est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles après la naissance du jeune. Il s'agit d'un fluide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté, d'une saveur douceâtre et d'un pH (6,6 à 6,8) légèrement acide, proche de la neutralité (Mekhaneg, 2020).

### I-1 Composition chimique du lait

Le lait est un produit d'origine biologique fortement altérable par voie microbienne et par voie enzymatique. C'est un milieu multiphasique : une phase aqueuse contenant essentiellement le lactose, les minéraux ; une phase dispersée de nature lipidique (globules gras) et une phase de nature protéique (micelles de caséines).

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

**Tableau I** : Composition générale du lait en g/100mL (Amiot *et al.*, 2002).

Composants	Valeur moyenne (g/100mL)
Eau	87,5
Matières grasses	3,7
Protéines	3,2
Glucides	4,6
Minéraux	0.9

L'eau, le composant majoritaire, conditionne l'état physique des autres constituants, en intervenant dans l'émulsion de la matière grasse et la dispersion des micelles de caséines. L'eau intervient dans le développement microbien et les altérations enzymatiques et non du lait (Talantikite, 2015). Lors de la transformation environ 75 à 80% de cette eau est retrouvée dans le lactosérum avec la majorité des composants polaires (lactose, vitamine hydrosolubles) (Mahaut *et al.*, 2000).

Les glucides du lait se présentent sous la forme du lactose à une dose de 47 à 52 g/l, c'est le glucide le plus abondant du lait de vache. Il joue un rôle important, lié notamment à sa valeur nutritionnelle et à sa fermentescibilité qui commande l'élaboration de divers produits laitiers. C'est un disaccharide réducteur qui existe sous deux formes isomères  $\alpha$  et  $\beta$ , formes se distinguant par certains caractères physiques (Mahaut et al., 2000).

La matière grasse du lait se présente sous la forme de petits globules sphériques qui sont invisibles à l'œil nu (Amiot et al., 2002). Elle se compose principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable, constituée en grande partie de cholestérol et de  $\beta$ -carotène.

Les protéines du lait, qui représentent 95% de la matière azotée du lait, se trouvent sous deux types : les caséines (80%) et les protéines du sérum (20%). Les composés azotés non protéiques du lait sont des protéases, des peptones et de l'urée (Dussault-Chouinard, 2019).

La caséine entière constitue 80% des protéines du lait, et se trouve sous forme micellaire. Il existe quatre principaux types de caséines, les caséines  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ . Parmi les caséines, la  $\kappa$ -caséine est la moins phosphorylée et la moins sensible à la précipitation par le calcium (Britten et Giroux, 2022). De plus, la  $\kappa$ -caséine est la seule caséine glycosylée, ce qui lui confère un caractère hydrophile (Britten et Giroux, 2022). Il existe également une caséine  $\gamma$  qui provient de l'hydrolyse de la caséine  $\beta$  par la plasmine (Krid et al., 2013).

La caséine  $\alpha_{S1}$  possède 199 acides aminés et un poids moléculaire de 23 kDa, ce qui en fait la protéine la plus importante en termes de masse. Cette caséine est extrêmement sensible au calcium au pH normal du lait (pH=6,7) quelle que soit la température et en présence de calcium, on constate une formation de flocons (Mekhaneg, 2020).

La caséine  $\alpha_{S2}$  possède 207 AA et 13 à 10 phosphates ( $\alpha_{S2}$  ou  $\alpha_{S3}$  ou  $\alpha_{S4}$  ou  $\alpha_{S6}$  selon le nombre de phosphates) et son poids moléculaire estimé varie de 25kDa, elle représente 8 à 11% de la micelle de caséine (Mekhaneg, 2020).

La Caséines  $\beta$  représentant 25 à 35% de la micelle, avec ses 209 AA et ses 5 groupements phosphates, elle possède beaucoup d'analogie avec la caséine  $\alpha_{S1}$  (Mekhaneg, 2020).

La Caséines  $\gamma$  s'agit des fragments C-terminaux résultant de la protéolyse de la caséine  $\beta$  par la plasmine (Mekhaneg, 2020).

La Caséines  $\kappa$  s'agit d'une protéine de 169 AA, phosphorylée (Serine 149) comportant deux variantes génétiques A et B. Elle comporte un constituant majeur non glycosylé et des

constituants mineurs glycosylés dont la structure précise est élucidée Une grande majorité de cette caséine se trouve à la surface de la micelle, accessible à la présure. (Mekhaneg, 2020).

## I-2 Micelles de caséine

Les caséines ont la particularité de se regrouper sous forme de micelles d'un diamètre moyen de 180 nm, qui sont formées à 92% de protéines et à 8% de minéraux (Figure 01). De plus, elles contiennent 3-4 kg d'eau par kg de protéine (Dussault-Chouinard, 2019).

La micelle de caséine est une matrice homogène de caséines dans laquelle sont dispersés les nanogroupes de phosphate de calcium. Les protéines s'associent entre elles par des interactions faibles, soit des interactions hydrophobes, des ponts hydrogènes ou encore de faibles attractions de Van der Waals (De Kruif *et al.*, 2012).

La charge nette des micelles est négative, ce qui leur permet de se repousser entre elles. Dans leur état natif, les micelles de caséines sont très stables. Elles peuvent être chauffées à 100°C et pressurisées à 100 MPa sans perdre leur intégrité (Dussault-Chouinard, 2019). Les grosses micelles ont une charge minérale plus élevée et des proportions relatives de caséines  $\beta$  et  $\kappa$  plus faibles que les petites (Talantikite, 2015).

Les micelles de caséines se précipitent toutefois sous l'effet de la présure ou de l'acidité à pH 4,6. Le gel formé par la coagulation des caséines, qui retient plus ou moins selon le cas la matière grasse, les minéraux, l'eau et les éléments solubles, est la base de produits tels le fromage et le yogourt (Dussault-Chouinard, 2019).

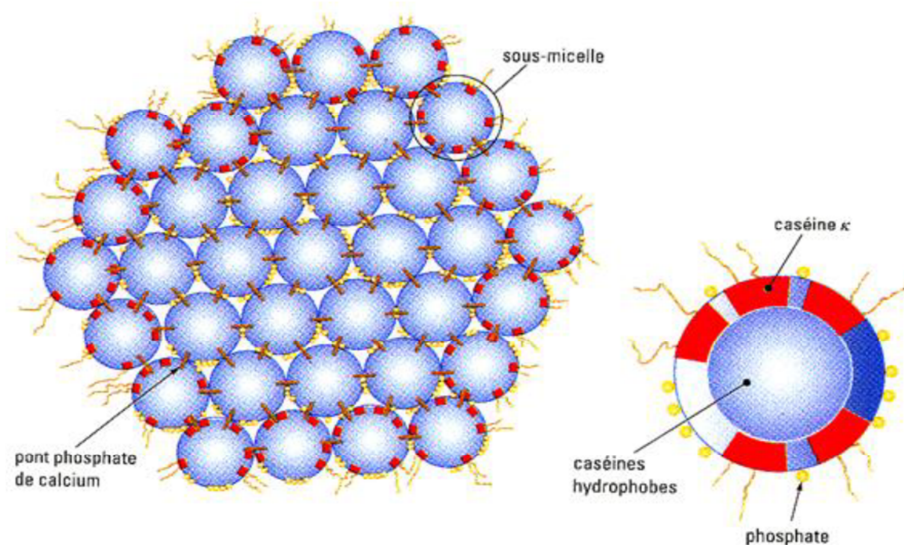


Figure 01 : Modèle de micelle de caséine avec sous-unités (Amiot *et al.*, 2002)

### I-3 Coagulation du lait :

La coagulation du lait est une étape importante dans le processus de fabrication du fromage (Talantikite, 2015). Elle correspond à une modification d'état physique irréversible des micelles de caséines. Celle-ci entraîne un passage du lait de l'état liquide à l'état semi-solide après formation d'un réseau protéique tridimensionnel appelé coagulum ou gel (Amimour, 2019). Elle est peut être obtenue par abaissement du pH (acidification), par action des enzymes coagulantes ou par action mixte.

#### I-3.1 Coagulation par voie acide :

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ( $\text{pI}=4.6$ ) par acidification biologique à l'aide des ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique ou par acidification chimique (injection de  $\text{CO}_2$ , addition de glucono-delta-lactone ou ajout de protéines sériques à pH acide). La voie chimique (acide organique) est uniquement utilisée en France pour la standardisation du pH du lait avant emprésurage. L'addition d'acide minéral n'est quant à elle pas autorisée (Talantikite, 2015).

#### I-3.2 Coagulation mixte :

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. La multitude de combinaisons conduisant à différents états d'équilibres spécifiques est à l'origine de la grande diversité des fromages à pâte molle et à pâte pressée non cuite (Mahaut *et al.*, 2000).

Les gels formés par cette coagulation mixte possèdent des caractéristiques intermédiaires entre celles du gel obtenu par voie acide et celle du gel obtenu par voie enzymatique (Amimour, 2019).

#### I-3.3 Coagulation par voie enzymatique :

La coagulation par voie enzymatique du lait s'effectue par l'hydrolyse des caséines par le biais des enzymes protéolytiques d'origine animale (veau, porc, poulet), végétale (artichaut, chardon, graines de citrouille) et microbienne (enzymes extraits de certains champignons, comme : *Mucorpusills*, *Endothiaparasitica*), ayant la propriété de coaguler le lait. L'enzyme animale la plus utilisée en fromagerie est la présure, provenant du sac gastrique (la caillette) des jeunes ruminants non sevrés (Amimour, 2019). La présure de veau était le premier MCE utilisé pour la fabrication du fromage, et cette enzyme est également connue pour sa grande spécificité pour le clivage du caséinomacropéptide de la  $\kappa$ -ca).



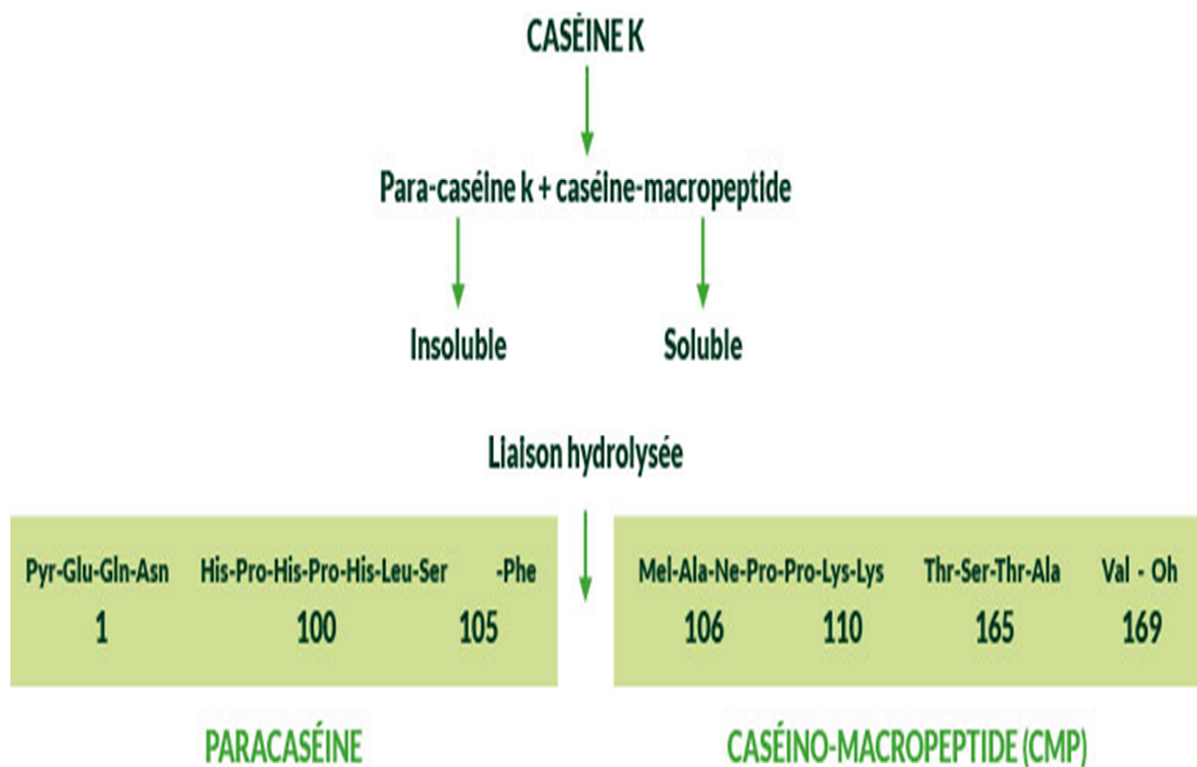
La présure de veau était le premier MCE utilisé pour la fabrication du fromage, et cette enzyme est également connue pour sa grande spécificité pour le clivage du caséinomacropeptide de la  $\kappa$ -caséine (Ribeiro *et al.*, 2017). Cette voie comporte trois phases :

➤ **Phase primaire ou d'hydrolyse enzymatique :**

Elle concerne l'hydrolyse de la caséine  $\kappa$ , au niveau de la liaison peptidique phénylalanine (105) et méthionine (106), qui conduit à la formation de paracaséine  $\kappa$  (1-105), et de CMP (106-169)(figure 02).

La libération du CMP se traduit par une réduction du potentiel de surface des micelles et en conséquence, une diminution des répulsions électrostatiques qui à l'état initial contribue à la stabilité du système colloïdal (Talantikite, 2015).

Cette phase est indépendante des ions de  $\text{Ca}^{2+}$  et elle se produit à des températures variées (de 0 à 50°) (Talantikite, 2015).



**Figure 02 :** Hydrolyse de la caséine  $\kappa$  par la présure, (Fox *et al.*, 1994).

➤ **Phase secondaire ou phase d'agrégation :**

Elle correspond à la phase physique, au cours de laquelle les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes. L'agrégation devient possible lorsqu'un certain degré d'hydrolyse est atteint puisqu'il existe un niveau minimum de caséine  $\kappa$  nécessaire à la stabilisation de la micelle (Benkahoul, 2016). Selon Mahaut et al., (2000) la réaction secondaire ne commence que lorsque le taux d'hydrolyse de la caséine  $\kappa$  atteint 80 à 90%.

➤ **Phase tertiaire ou de formation du gel :**

Les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations : des liaisons de nature variées établissent entre les micelles (électrostatiques, hydrophobes et salines) pour former un gel constitué par un réseau lâche emprisonnant le lactosérum et la matière grasse (Mekhaneg, 2020).

#### **I-4 Enzymes coagulants du lait :**

Les enzymes coagulantes, la présure ou ses substituts, sont des endopeptidases appartenant au groupe des aspartyl protéases. Ces enzymes ont une double activité l'une très spécifique sur la caséine  $\kappa$ , l'autre de protéolyse générale portant sur toutes les protéines, qui sont susceptibles de se manifester aux cours de l'affinage des fromages (Talantikite, 2015).

La majorité des enzymes coagulants le lait sont connus comme des protéases à aspartate et sont distribués d'une façon endémique chez la plupart des vertèbres, plantes, levures, parasites *fungi* et virus (Naouni, 2009).

La présure de veau est la préparation coagulante traditionnelle la plus utilisée pour la coagulation du lait. De moindres quantités sont obtenues à partir de l'estomac de chevreau et d'agneau. La dénomination présure est réservée à l'extrait coagulant provenant de la troisième poche de l'estomac appelée caillette (Talantikite, 2015). Elle renferme deux enzymes actives, la chymosine et la pepsine.

La chymosine est la protéase majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale. Elle est stable entre pH 5 et 6 ; son activité est optimale à pH voisins de 5 ; elle est inactivée à pH 7,5 et dénaturée à pH 8. Sa température optimale d'action est voisine de 40°C. L'inactivation thermique débute vers 50°C pour atteindre le maximum à 61°C (Talantikite, 2015).

La pepsine est le constituant mineur de la présure dont la sécrétion gastrique ne devient prépondérante qu'après sevrage. Elle est produite sous forme d'un précurseur inactif, le pepsinogène. Il passe par acidification sous la forme active : la pepsine de poids moléculaire 35 kDa. Elle est thermosensible en solution après 55°C températures à 70°C. Elle est relativement stable à des pH compris entre 5 et 5,5. Son activité enzymatique est plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat (**Talantikite, 2015**).

### I-5 Succédanés de la présure :

La coagulation du lait est une étape importante pour la préparation du fromage. L'ancien coagulant utilisé en fromagerie est la présure. Cependant, et à la suite d'une pénurie mondiale croissante, de nombreuses recherches ont été développées pour sélectionner des succédanés utilisables industriellement d'origines diverses : microbiennes, végétales et animales (**Krid, 2013**).

De nombreuses protéases sont capables de provoquer la coagulation du lait, mais toutes ne sont pas pour autant aptes à la fabrication fromagère car elles ne présentent pas les propriétés biochimiques et technologiques requises (**Talantikite, 2015**).

Les inconvénients majeurs de l'utilisation des protéases de remplacement sont dans certains cas, la baisse du rendement fromager (**Amiot et al., 2002**). Les protéases, en plus de leur activité coagulante, interviennent dans l'affinage des fromages. (**Mahaut et al., 2000**).

#### I-5.1 Succédanés de la présure d'origine animale :

Les enzymes sécrétées par l'estomac des mammifères sont celles qui sont intéressantes pour la fromagerie. Dans cet intervalle sont incluses les pepsines de différente espèce animale, principalement bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire. Ces différentes pepsines sont parfois utilisées en mélange avec la présure à des proportions variables qui dépendent du type de fromage à préparer (**Krid, 2013**).

L'utilisation de la pepsine du lapin, comme agent susceptible de remplacer la présure, a été rapportée par Abd-EL-Rahman et al. En 1990. Par ailleurs, la pepsine du pro-ventricule du poulet a été utilisée dans la fabrication de fromages locaux en Israël (**Cuvellier, 1999**).

La paroi interne de l'estomac de la morue de l'atlantique secrète une pepsine qui permet de coaguler le lait à 15°C plus efficacement que la chamoisine de veau d'où la possibilité, selon **Haard et al. (1980)**, de contrôler l'activité protéolytique excessive par inactivation thermique.

La pepsine de chinchard est une enzyme extraite de l'estomac de ce poisson. Elle est connue pour sa capacité coagulante, ce qui en fait un ingrédient clé dans la production de succédanés de

présure à base de l'estomac de chinchard. Cette enzyme est utilisée dans l'industrie fromagère pour coaguler le lait et former le caillé, essentiel à la fabrication de divers types de fromages

L'estomac de chinchard est choisi comme source pour la pepsine en raison de sa richesse en enzymes coagulantes. Lors du processus de fabrication des succédanés de présure, les estomacs de chinchard sont traités pour isoler et extraire la pepsine. Après purification et séchage, le résultat final est un succédané de présure contenant cette enzyme coagulante provenant de l'estomac de chinchard.

### I-5.2 Succédanés de la présure d'origine végétale :

Contrairement à la présure qui est spécifique à la  $\kappa$ -caséine, les aspartyl-protéases des plantes peuvent hydrolyser les caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ , ce qui provoque, une amertume et des défauts de texture des fromages et qui limite leur utilisation industrielle. Plusieurs préparations coagulantes sont issues du règne végétal et sont extraites par macération de différentes parties de plantes supérieures.

L'utilisation de chardon laiteux, scientifiquement appelé *Silybummarianum* comme agent coagulant a été considérée comme l'un des facteurs déterminants de la qualité des fromages typiques portugais au lait de brebis.

D'autres végétaux fournissent des coagulases telles que les ficines extraites du latex du figuier, la papaine du papayer, la bromélaïne de l'ananas (Talantikite, 2015).

### I-5.3 Succédanés de la présure d'origine microbienne :

Déférents alternatives microbiennes sont utilisées pour la production de la présure, mais cette technologie n'est pas adaptée à la production de fromage de qualité. Ils sont responsables du gout amer (Walsh et li, 2000; Kumar et al, 2006).

De nombreux espèces de bactéries ont été étudiées, notamment celles appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* (*Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus coagulans*). Les résultats ont été en général décevants en raison de l'activité protéolytique généralement très élevée de ces protéases par rapport à celle de la présure. La protéase de *Bacillus cereus* dégradait rapidement la caséine entière (Mekhaneg, 2020).

Il existe aussi des protéases fongique ont donné de de meilleurs résultats, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure (Mekhaneg, 2020).

## I. Matériel et méthodes :

Afin d'atteindre l'objectif de la présente étude, sept échantillons ont été explorés afin d'étudier leur activité protéolytique. Ces échantillons appartiennent au règne animal à savoir le tube digestif du lapin *Oryctolagus cuniculus*, les proventricules du poulet *Gallus gallus domesticus* et l'estomac des poissons ; la Lotte *Lota lota*, le chinchard *Trachurus* , le Bouldogue *Carcharhinus leucas* et la Raie *manta océanique* . Un seul échantillon appartenant au règne végétal a été choisi, qui est la plante du chardon laiteux *Galactite tomenteuse*.

### I.1 Matériel végétal et animal :

La récolte du chardon laiteux, a été faite au mois de mars à Ait Smail. Les parties récoltées sont les feuilles et les tiges, en fonction de la localisation de l'enzyme recherchée.

Les feuilles, fleurs et tiges récoltées ont été séchées ensoleillées pendant un certain temps. Une fois séchées, elles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre. Les particules obtenues ont été tamisées à l'aide de tamis de diamètre 250 µm pour obtenir une poudre homogène.

Les poudres de feuilles, fleurs et tiges ainsi obtenues ont été stockées dans des récipients en verre opaques et scellés hermétiquement, puis conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à l'extraction.

Les échantillons du poisson sélectionnés ont été récupérés au niveau du poissonnier de la ville de Bejaia. Les tubes digestifs du lapin et les proventricules du poulet ont été récupérés, de chez un boucherie de la ville de Bejaia. Tous les échantillons sont transportés au frais jusqu'au laboratoire de technologie alimentaires. Une fois bien nettoyés et lavés, les parties recherchées sont conservées au frais jusqu'à l'extraction.

### I.2. Préparation des extraits enzymatiques :

#### I.2.1. Procèdes d'extraction de l'enzyme végétale :

L'extraction est réalisée selon la méthode décrite par **Sousa et Malacata (2002)** et **Lamas et al. , (2001)**.

Une prise d'essai de la poudre (1 g) solubilisée dans 7 mL de tampon phosphate (0.05 M, pH=5.5) puis laissés au réfrigérateur pendant une nuit. Puis filtrée sur du papier filtre, et le

filtrat récupéré est centrifugée à 15 000 g pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant récupéré, qui représente l'extrait enzymatique brut, est réparti dans des Eppendorfs de 2 mL, et gardé au congélateur.

### **I.2.2. Procédés d'extraction de l'enzyme animale :**

L'extraction des extraits enzymatiques des échantillons animaux étudiés a été réalisée selon la méthode adoptée par **Maachou (2011)** en utilisant le tampon d'acétate de sodium 1M à pH 5.

Une macération a été réalisée pendant trois heures sous agitateur magnétique. La solution obtenue a été filtrée à l'aide d'un papier filtre pour obtenir l'extrait enzymatique. L'extrait obtenu a été placé dans un tube, puis centrifugé à 4000 tours/minute pendant 15 minutes pour séparer le culot du surnageant. Ensuite, à l'aide d'acide chlorhydrique à 12 %, le zymogène obtenu a été activé à pH 2 pendant 30 minutes pour obtenir de la pepsine. Un ajustement du pH à 5 a été effectué avec du NaOH, nécessaire pour stabiliser l'enzyme. Enfin, la pepsine obtenue a été conservée au réfrigérateur à + 4 °C.

### **I-3 Caractérisation physico-chimique de l'extrait brut :**

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

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

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

La teneur en protéines totales des extraits enzymatiques a été déterminée selon la méthode de **Bradford (1976)**. Cette méthode colorimétrique repose sur l'adsorption du bleu de Coomassie G-250 sur les protéines. Une fois lié aux protéines, le bleu de Coomassie vire au bleu avec une absorbance maximale autour de 595 nm, dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. Pour 500 µL de chaque extrait enzymatique, 2 mL de réactif de Bradford ont été ajoutés. Après homogénéisation avec

un vortex, le mélange a été conservé à l'obscurité et à température ambiante pendant 20 minutes. Ensuite, l'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre à 595 nm. La concentration en protéines des extraits enzymatiques a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec la protéine de sérum albumine bovine (SAB) dans les mêmes conditions expérimentales.

#### **I.4. Mesure des activités enzymatiques :**

##### **I.4.1. L'activité enzymatique :**

Des extraits bruts ont été estimés par deux méthodes : la mesure de l'activité protéolytique et l'évaluation de l'activité coagulante.

##### **I.4.2. L'activité protéolytique :**

L'activité protéolytique (AP) est évaluée en utilisant la méthode décrite par **Green et Stackpoole (1975)**. Cette méthode mesure le taux de dégradation du substrat (caséine) par l'enzyme pendant la phase enzymatique primaire. Pour cela, nous mesurons la concentration de produits d'hydrolyse de la caséine, qui sont solubles dans l'acide trichloracétique (TCA) à une concentration finale de 12%.

Notre évaluation de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques repose sur l'utilisation de la caséine comme substrat. Lorsque la caséine est hydrolysée par une protéase, de la tyrosine ainsi que d'autres acides aminés sont libérés. L'activité protéolytique est mise en évidence par un dosage colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, selon la méthode de **Lowry (1951)**.

. L'activité est calculée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme étalon.

Une unité de protéase (U) correspond à la libération d'1 µg de tyrosine en une heure de digestion par 1 mL d'extrait enzymatique, en utilisant soit la caséine, soit l'hémoglobine comme substrat (**Mechakra, 1999**).

La procédure réactionnelle consiste à mélanger 1 g de caséine dans 50 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7). Un volume de 1 mL de ce mélange est ensuite ajouté à 1 mL d'extrait enzymatique, puis agité vigoureusement et incubé au bain-marie à une température de 35 °C pendant 20 minutes.

La réaction est ensuite arrêtée en ajoutant 5 mL de TCA à 5% et laissée en repos pendant 15 minutes à température ambiante. Ensuite, le mélange est centrifugé et 0,5 mL de surnageant est mélangé avec 2,5 mL de la solution C, préparée en mélangeant 100 mL de la solution A avec 2 mL de la solution B. La solution A est préparée en mélangeant 1 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 5 g de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) dans 250 mL d'eau distillée. La solution B est préparée en mélangeant 0,1 g de tartrate sodium-potassium (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>) et 0,032 g de sulfate de cuivre CuSO<sub>4</sub> dans 10 mL d'eau distillée. Après une incubation de 10 minutes à 35 °C, un volume de 250 µL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au 1/2) est ajouté. Une fois le mélange bien agité et incubé à une température de 35 °C pendant 20 minutes, une coloration bleue apparaît, et l'absorbance est mesurée à 660 nm. La concentration en tyrosine des extraits est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec de la tyrosine dans les mêmes conditions expérimentales. L'activité protéolytique, exprimée en µg/h.ml, correspond à la libération d'1 µg de tyrosine résultant de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans 1 mL de substrat. À partir de l'activité protéolytique, nous calculons une activité spécifique, exprimée en U/mg.

L'activité spécifique est définie comme le rapport entre l'activité enzymatique et la teneur en protéines de l'extrait enzymatique.

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

### I.5. Evaluation de l'activité coagulante :

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

La technique consiste à ajouter à 100 ml de CaCl<sub>2</sub> (0.01M) ,12 g de lait écrémé avec ajustement du pH à 6,5. À 1 ml de l'extrait enzymatique. Le temps de coagulation est mesuré à 35 °C ; et correspond au temps nécessaire à l'apparition des premiers flocons dans un mince film de lait s'écoulant sur la paroi du tube incliné.

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

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



Avec :

**UP** = unité présure ;

**V** = volume de lait (substrat de Berridge) ;

**10** = volume du substrat standard (10 mL) ;

**100** = temps de coagulation du substrat standard (100 secondes) ;

**v** = volume de l'extrait d'enzyme;

**t** = temps de floculation en seconde.

L'activité coagulant peut être aussi exprimée sous forme de force coagulante en unités Soxhlet (**Moschopoulou, 2011**). En pratique, la force est exprimée par le rapport du volume en litre de l'extrait enzymatique à celui du lait coagulé. Ainsi, un extrait de force 1/10 000 signifie qu'un litre de l'extrait enzymatique provoque la coagulation de 10 000 litres de lait à 35 °C pendant 40 min (**Alais, 1974**). La force coagulante (F) est calculée selon la formule suivante :

$$F = \frac{2400 * V}{t * v}$$

Avec :

**V**: volume de lait ;

**v** : volume de l'extrait de l'enzyme ;

**T** : temps de coagulation en secondes ;

**2400**: temps d'incubation (40min) x 60 secondes.

## **I.6 Étude des paramètres influençant l'activité enzymatique :**

### **I.6.1.Effet de la température sur l'activité coagulante :**

L'influence de la température sur l'activité coagulante est étudiée en mesurant l'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut des échantillons, à différentes températures et en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique, préparé dans les mêmes conditions, à savoir la concentration en CaCl<sub>2</sub> (0.01 M), et le même pH 6,4.

Les températures utilisées sont : 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60°C pour l'extrait enzymatique brut des échantillons.

### **I.6.2.Effet du potentiel hydrogène sur l'activité coagulante :**

Afin d'étudier l'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique des échantillons étudiés, le pH du lait (substrat de Berridge) est ajusté aux valeurs de : 6 ; 6,5

; 7 ; 7,5 ; 8 pour l'extrait enzymatique brut des échantillons étudiés, par l'addition des solutions de HCl (0,1 N) ou de NaOH (0,1 N).

La température du lait est ramenée à 60 °C pour l'extrait enzymatique brut des échantillons la température est à 37 °C afin de mesurer le temps de coagulation qui correspond au temps s'écoulant entre l'addition de 0,5 ml l'extrait enzymatique à 5 ml du substrat de **Berridge** et l'apparition des premiers flocons caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne du tube incliné subissant un lent mouvement de rotation.

Le pH est ajusté par addition d'une solution d'HCl ou de NaOH 1 N. Le choix de cet intervalle de pH est basé sur le fait qu'à des valeurs de pH inférieures à 5,8, la coagulation peut devenir une coagulation acide. L'augmentation du pH à des valeurs supérieures à 7,0 peut provoquer l'inactivation de la protéase employée. En outre, la coagulation du lait, en fromagerie, est réalisée à des pH inférieurs à 7,0.

### **I.6.3. Effet de la concentration en chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) sur l'activité coagulante :**

L'influence de la concentration de CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés est réalisée à 35°C à pH de 6,4, en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique, préparés avec des différentes concentrations du lait en ions de CaCl<sub>2</sub> : 0.005M, 0.02M, 0.03M, 0.04M, 0.05M.

### **I.6.4. Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante :**

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

## **I.7. Elaboration d'un fromage frais**

Par les extrais étudiés et par la présure Un fromage frais est préparé, en suivant les étapes du processus de (**Luquet, 1987**), le lait utilisé est un lait cru de chèvre, transporter au laboratoire glacé, le lait est pasteurisé à 90°C. A la fin de cette opération, le lait est réparti dans trois béchers stériles, on plonge les récipients dans un bain de glace, jusqu'à température optimale d'ensemencement pour chaque extrait enzymatique.

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

L'ensemencement de chaque lait, est réalisé, avec un volume de 15 ml d'extrait de chardon laiteux, 15ml d'extrait de poisson et une solution de présure ( 2g de poudre présure dans 10 ml de l'eau distillé , 1g de NaCl et ajouté ) respectivement. La coagulation a été réalisée dans une étuve thermostatée à 45°C pendant 12h environs, jusqu'à l'obtention du caillé, qui sera découpé à l'aide d'un couteau, et transvasé sur une toile pour l'égouttage. Cette opération, est améliorée par une pression à la main de la toile. Les caillés bien égouttés sont répartis dans des récipients de conservation, additionnés d'NaCl.



**Figure 03** : Photographie des échantillons de fromage élaborés .

A : Chardon laiteux

B : chinchard

### I.8. Rendement fromager :

Le rendement fromager est calculé selon la méthode décrite par AFNOR 1980, en utilisant la formule suivante :  $(Pc / Pl) \times 100$

Avec :

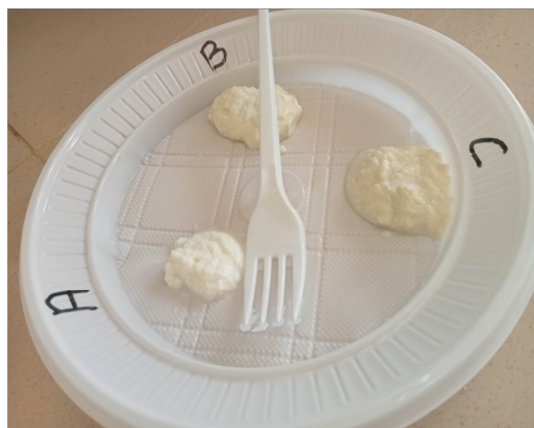
Pc= poids du coagulum.

Pl= poids du lait

### I.9. Analyse sensorielle des fromages :

La réalisation de l'analyse sensorielle a pour but de comparer entre les fromages, dont le premier issu de la coagulation par la pepsine de chinchard, le second par la pepsine du chardon laiteux et le troisième issu de la coagulation par la présure, ainsi que d'estimer le degré d'acceptabilité du (**Figure 03**).

L'évaluation sensorielle des produits expérimentaux a été réalisée au niveau du laboratoire technologie alimentaire, de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, et ceci en présence d'un jury de dégustateurs dont la majorité d'âge de 20 à 35 ans. Une présentation de 3 échantillons de fromage de portion de (5g) est exposée de façon anonyme aux dégustateurs (**Figure 04**). Un questionnaire portant des critères bien établis est présenté.



**Figure 04** : Photographie des échantillons de fromage frais obtenu.

### I. Caractérisation physico-chimique des extraits enzymatiques végétales et animale :

Après l'opération d'extraction effectuée, un extrait d'origines végétales et un extrait d'origine animale ont été récupérés.

- **L'extrait enzymatique animal** : de l'estomac de poisson de chinchard ou *Trachurus* spp.
- **L'extrait enzymatique végétale** : du chardon laiteux

Les résultats de la caractérisation des extraits enzymatiques obtenus sont représentés dans le tableau I.

**Tableau II** : Caractéristiques physicochimiques des extraits enzymatiques de chinchard et chardon laiteux.

/	<b>Chardon laiteux</b>	<b>Chinchard</b>
<b>Protéine (mg/mL)</b>	90,46 ± 0,1	93,52 ± 1,42
<b>Activité protéolytique (µg/mL.min)</b>	17,53 ± 1,2	70,4 ± 4,4
<b>Activité protéolytique spécifique (µg/mL.min)</b>	0,19	0,75
<b>Force coagulante(F)</b>	1,988	3,5
<b>Couleur</b>	Verdâtre	Blanchâtre
<b>Texture</b>	Liquide	Liquide

**Le rendement :**

**Tableau III :** tableau représente le rendement de fromage chinchard et de chardon laiteux .

/	Chinchard	Chardon laiteux	Présure
<b>Rendement (%)</b>	16,40 %	13,06 %	/

L'extrait de chinchard obtenu est une solution de couleur blanchâtre présente un aspect liquide.

L'extrait enzymatique du chardon laiteux est une solution de couleur verdâtre avec un aspect liquide.

Le rendement d'extrait enzymatique de chinchard est de 16,40% par contre le rendement d'extrait enzymatique de chardon laiteux est de 13,06%.

D'après les résultats obtenus, la teneur en protéine des extraits enzymatiques la plus élevée est retrouvée dans l'extrait enzymatique (pepsine) de chinchard  $93,52 \pm 1,42$  (mg/mL) et de  $90,46 \pm 0,1$ (mg/mL) dans l'extrait enzymatique chardon laiteux.

Ces résultats ont montré également que l'extrait d'origine végétale possèdent moins de protéines par rapport à l'extrait enzymatique d'origine animale.

L'activité protéolytique est basée sur l'estimation de la quantité de peptides simples et des acides aminés libres formés par l'hydrolyse d'une protéine sous l'action d'une protéase ou un mélange de protéases.

Les résultats obtenus de l'estimation de l'activité protéolytique (exprimée par le taux de tyrosine libéré) des extraits enzymatiques étudiés indiquent que l'activité protéolytique de l'extrait animal (pepsine de la chinchard) est de  $70,4 \pm 4,4$  ( $\mu\text{g/mL. Min}$ ), plus élevée que celle des extraits enzymatiques d'origine végétale (chardon laiteux)  $17,53 \pm 1,2$  ( $\mu\text{g/mL. Min}$ ).

Pour la production des fromages de qualité, il faut tenir compte de leur grande activité protéolytique non spécifique supplémentaire qui leur donne le pouvoir d'hydrolyser les caséines  $\alpha$  et  $\beta$  (Lapointe-Vignola 2002).

L'activité protéolytique spécifique de l'extrait enzymatique d'origine animale (chinchard 0,75 ( $\mu\text{g/mL. Min}$ )) est plus élevée par rapport à l'extrait d'origine végétale (chardon laiteux 0,19 ( $\mu\text{g/mL. Min}$ )).

Les résultats de la présente étude ont montré que les extraits étudiés possèdent tous une activité coagulante remarquable, et ceci par la capacité des protéases de chardon laiteux ainsi des pepsines de chinchard à coaguler le lait.

Et pour la force coagulante du chinchard, on la compare à celle du chardon laiteux, on remarque que la force coagulante du chinchard (3,5) est supérieure à celle du chardon laiteux (1,988).

Les résultats de la présente étude montrent que les deux extraits ont des forces coagulantes différentes.

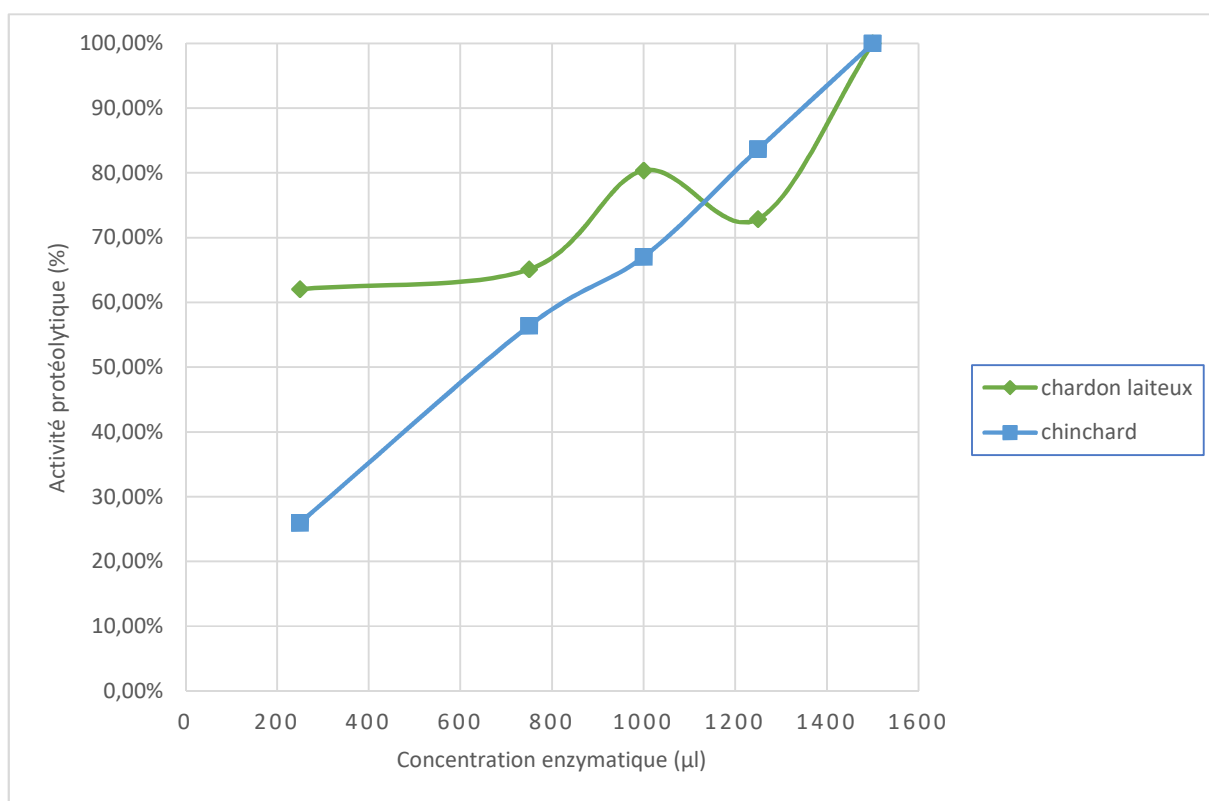
Cette différence peut être attribuée à plusieurs facteurs, tels que le caractère variétal, lié au sol, les conduites agronomique et le climat, ainsi que le taux d'ensoleillement (**Durand et Chantraine 1982**).

La différence de la force coagulante peut être aussi liée au pH d'emprésurage qui influe directement sur la force coagulante des enzymes, Le temps de floculation diminue davantage lorsque le pH est abaissé au-dessous de sa valeur normale dans le lait. Toutes les enzymes coagulantes de fromagerie sont des protéases à caractère acide.

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

### II.1. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité coagulante :

L'effet de la concentration des extraits enzymatiques de chinchard et chardon laiteux sur l'activité coagulante a été étudiée en variant la concentration de ces extraits aux valeurs de 250 $\mu$ L ; 750 $\mu$ L ; 1000 $\mu$ L ; 1250 $\mu$ L ; 1500 $\mu$ L. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante :



**Figure 05 :** L'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante.

Les résultats obtenus, de l'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité coagulante, indiquent une augmentation de l'activité coagulante avec l'augmentation de la concentration en enzyme.

L'activité coagulante la plus élevée pour chinchard et chardon laiteux est atteinte à la concentration de 1500 $\mu$ L.



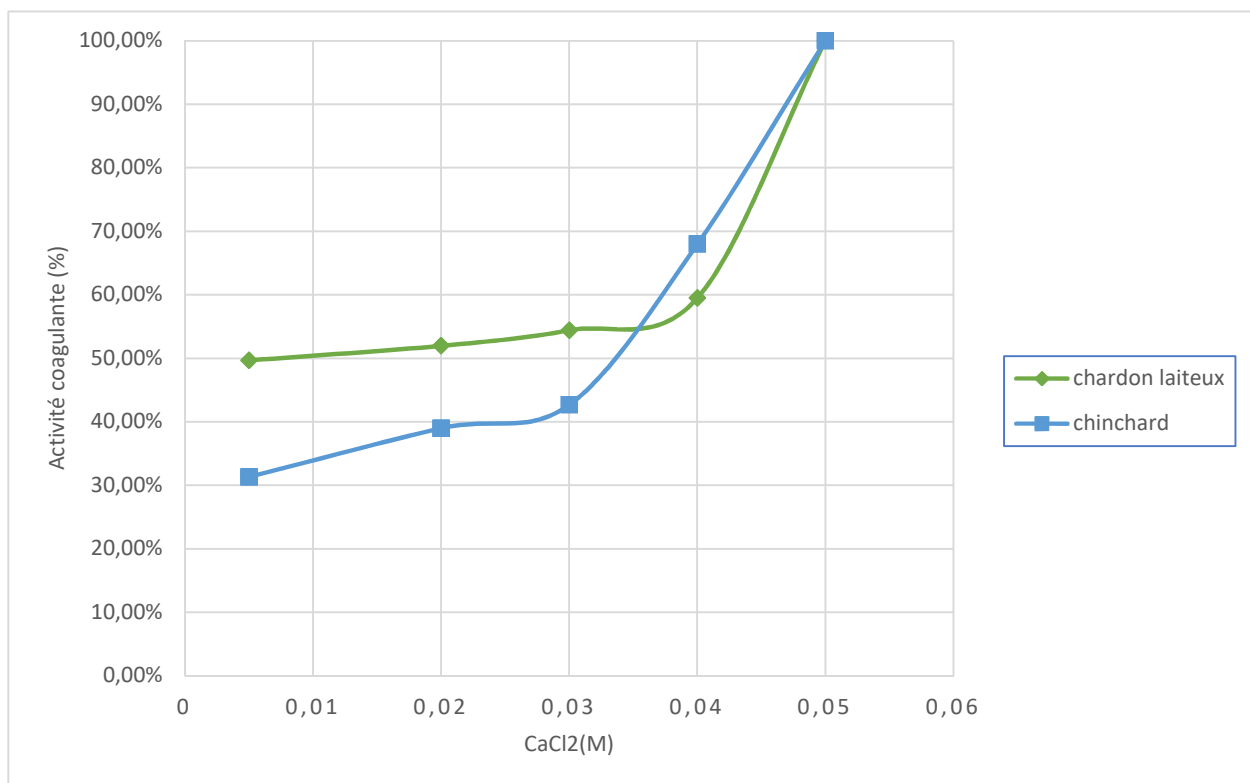
Selon **Ramet et Weber (1980)** la concentration en enzyme dans les limites utilisées en fromagerie influe aussi sur la vitesse de raffermissement du gel. Elle n'a en revanche pas d'effets sur la fermeté.

## II.2. Effet de la concentration de $\text{CaCl}_2$ sur l'activité coagulante

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

L'effet de la concentration du  $\text{CaCl}_2$  du lait sur l'activité coagulante de l'extrait animale (chinchard) et végétale (chardon laiteux) a été étudié en variant la concentration du  $\text{CaCl}_2$  du lait aux valeurs de 0,005 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 ; 0,05 M.

Les résultats obtenus, sont représentés dans la figure N°2.



**Figure 06 :** L'effet du  $\text{CaCl}_2$  sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés

Les résultats obtenus, de la présente étude, montrent que l'activité coagulante des extraits augmente avec l'augmentation de la concentration de  $\text{CaCl}_2$ , dont l'activité, la plus élevée est observée à la concentration de 0,05M pour l'extrait enzymatique de chinchard et chardon laiteux.

Pour l'extrait de chardon laiteux l'activité passe de 49,67 % à la concentration 0,005 M et atteint son optimal aux valeurs 0,05 M à 100 %.

Pour l'extrait de chinchard l'activité passe de 31,32 % concentration 0,005 M et atteint son optimale aux valeurs 0,05 M à 100 %.

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

Selon **Daviau et al (2000)**, le calcium a des effets opposés en fonction de sa concentration PH. Le calcium apporté sous forme de  $\text{CaCl}_2$  entraîne une augmentation de la force ionique, une diminution de PH et une élévation du produit de solubilité apparent du phosphate de calcium. Il en résulte alors une augmentation des concentrations en calcium soluble et ionique.

Le chlorure de calcium empêche les charges positives et négatives des micelles et augmente leur hydratation (**Zoon, 1989**). Ceci est en accord avec les résultats trouvés par d'autres auteurs (**Daviau, 2000 ; Najera, 2003**), indiquant que les interactions électrostatiques ainsi que les répulsions stériques jouent un rôle complémentaire dans la déstabilisation du système micellaire.

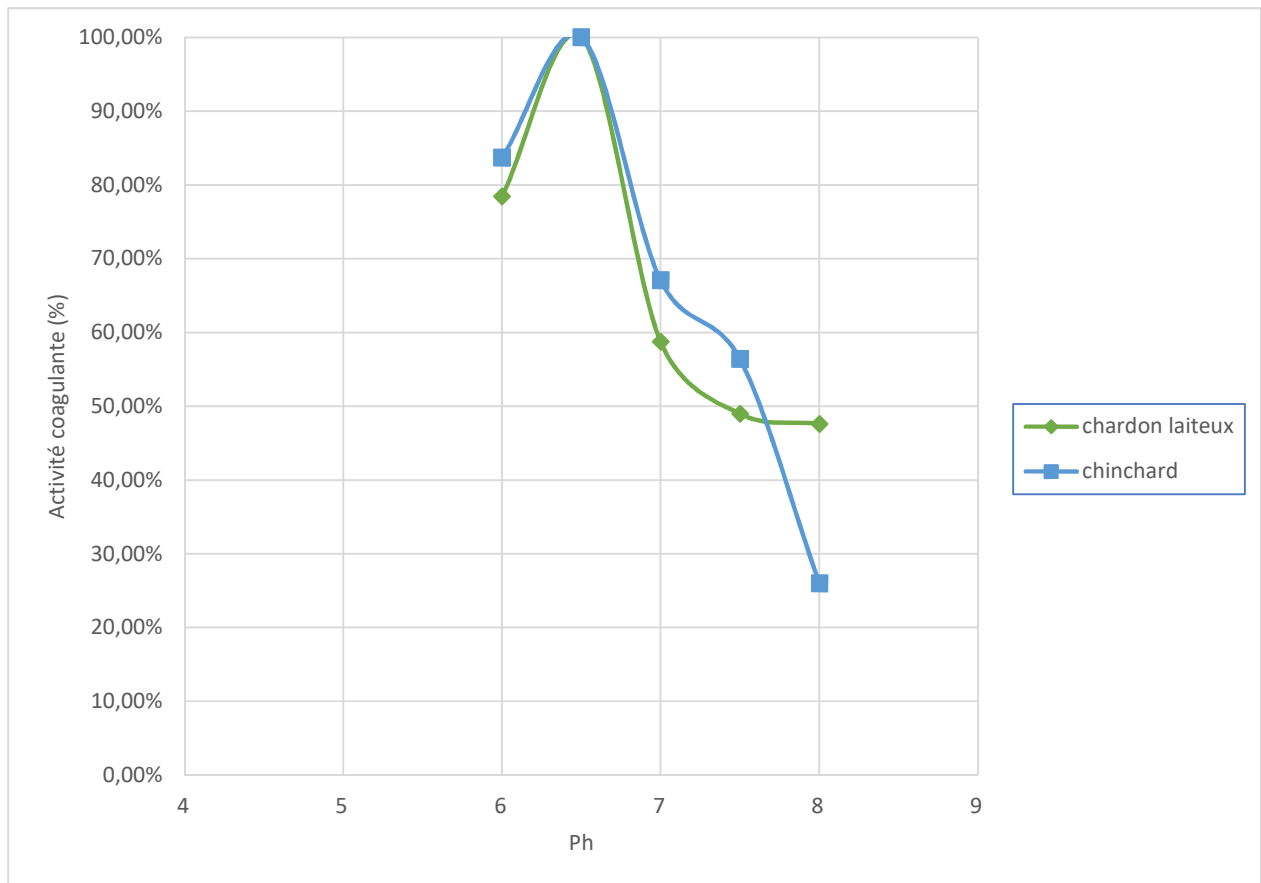
Ce résultat confirme que l'effet du calcium sur le taux de raffermissement du gel est fortement dépendant du PH car le couple PH et concentration du lait en chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) est la seule combinaison qui affecte la fermeté du coagulum et la vitesse de formation du gel (**Najera , 2003; Mietton , 2004**).

### II.3. Effet du PH sur l'activité coagulante :

Le potentiel d'hydrogène influence le fonctionnement des enzymes. De ce fait, il existe un pH optimal, autour duquel l'enzyme fonctionnera le mieux et sera plus efficace. Ce pH optimal, propre à chaque enzyme, se situe généralement pour la plupart des enzymes aux alentours de 6-7 (PH neutre), et plus on s'éloigne de cette valeur, plus l'enzyme est dénaturée.

En effet, l'acidité du milieu peut déformer la structure tertiaire d'une enzyme de façon plus ou moins importante. Cette déformation de l'enzyme modifie son action, et ne fonctionne plus normalement et sa vitesse catalytique est réduite (**Robitaille et al., 2012**).

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



**Figure 07 :** Représentation graphique de l'influence du pH sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

Les résultats obtenus montrent que l'activité coagulante maximale est atteinte à la valeur du PH égale à 6,5 pour les deux extraits animal (chinchard) et végétale (chardon laiteux).

Pour l'extrait de chardon laiteux l'activité passe de 78,45 % a PH = 6 et atteint son optimum aux valeurs proches de PH = 6,5 à 100 % suivie par une perte importante de l'activité de coagulation du lait aux valeurs proches de pH = 7.

Pour extrait enzymatique du chinchard l'activité passe de 83,68 % a PH = 6 et atteint son optimum aux valeurs proches de PH = 6,5 à 100 % suivie par une perte importante de l'activité de coagulation du lait aux valeurs proches de PH = 7,5.

L'influence de l'acidification sur le temps de floculation résulte pour une part d'un effet sur l'activité de l'enzyme, et d'autre part sur la réaction d'agrégation par suite de la diminution de la stabilité des micelles, liées à la neutralisation des charges négatives, et la libération d'ion calcium à partir des complexes dissous et colloïdaux (**Ramet, 1997**).

**Green et al. (1984)** ont indiqué que lorsque le PH du lait est abaissé à 6,5 l'activité coagulante de l'extrait pepsiniques subit une double augmentation.

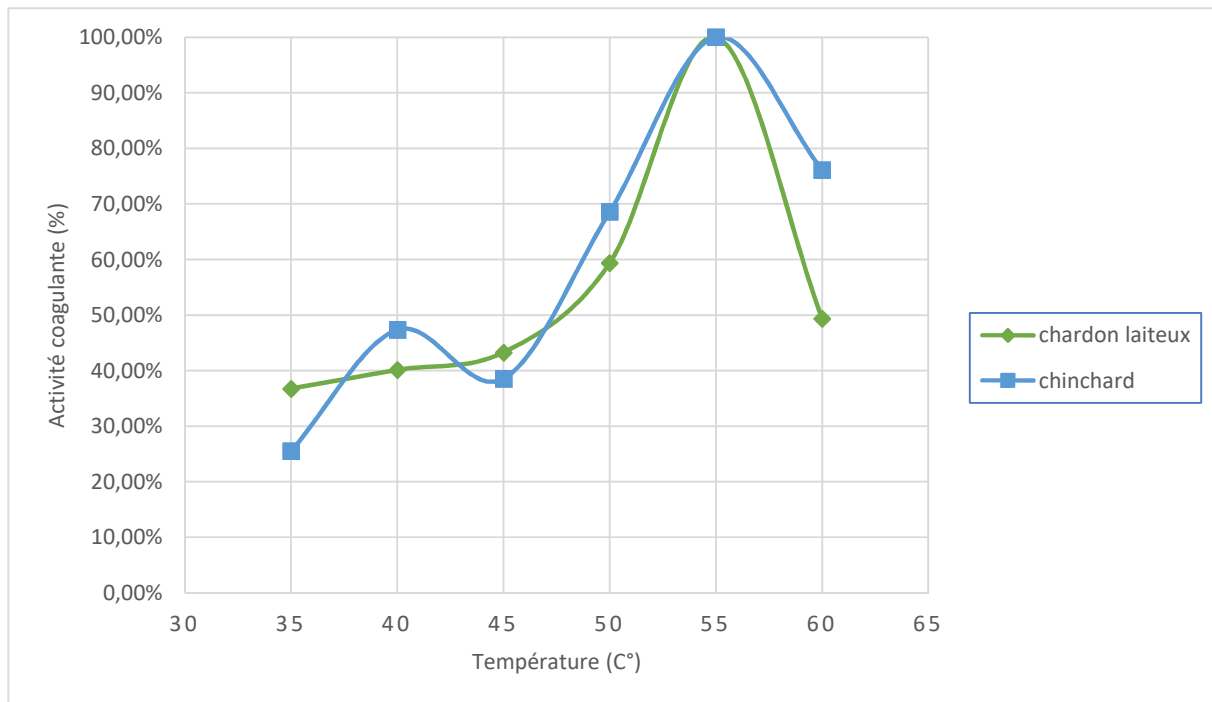
**D'Ambrosio et al. (2003)** ont indiqué que la pepsine purifiée du poisson a une activité optimale enregistrée aux valeurs de PH de 6,5 et 7,5.

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

#### **II.4. Effet de la température sur l'activité coagulante**

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

Les résultats obtenus, de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits sont représentés dans la Figure N°4.



**Figure 08 :** Représentation graphique de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

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

Pour l'extrait du chardon laiteux, l'activité passe de 36,78% à température de 35°C et atteint son optimum aux valeurs 100% à 55 °C et décroît à 60 °C, et à partir de 65 °C, on remarque la dénaturation et l'activité enzymatique est suspendue.

Pour l'extrait enzymatique de chincharde l'activité passe de 25,54 % à 35 °C atteint son optimum aux valeurs proches de 100 % à 55 °C et décroît à 60 °C. A partir de 65 °C l'enzyme du chincharde devient inactive.

**Robitaille et al.**, (2012) ont mentionné aussi que chaque enzyme possède une température optimale spécifique. Plus cette température baisse, plus le mouvement moléculaire sera réduit et plus la cinétique enzymatique sera lente et l'enzyme devient inactive.

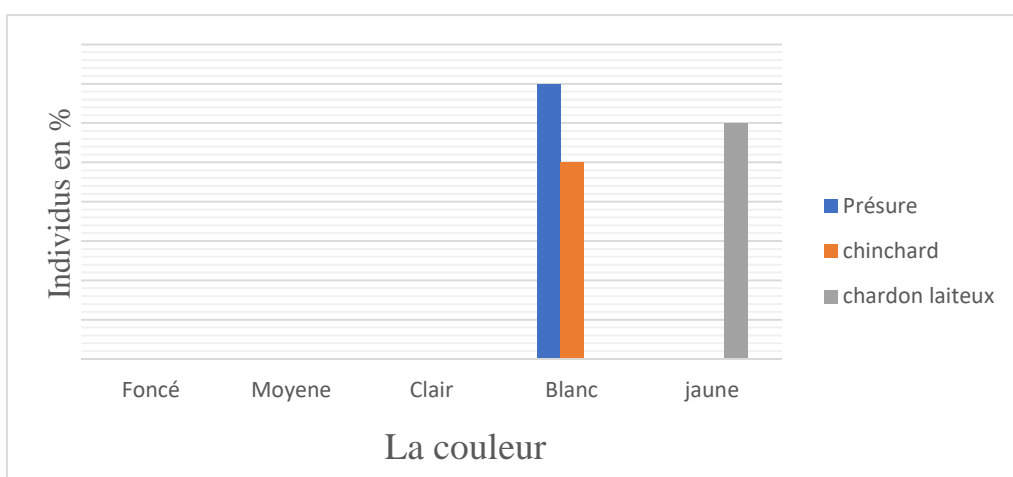
Le processus de l'inactivation de l'enzyme à des taux extrêmement élevés de températures s'étale sur deux étapes, d'abord par l'ouverture partielle des structures ; secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme qui sont dues à la rupture des liaisons covalente et des liaisons hydrophobes. Plus loin,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

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

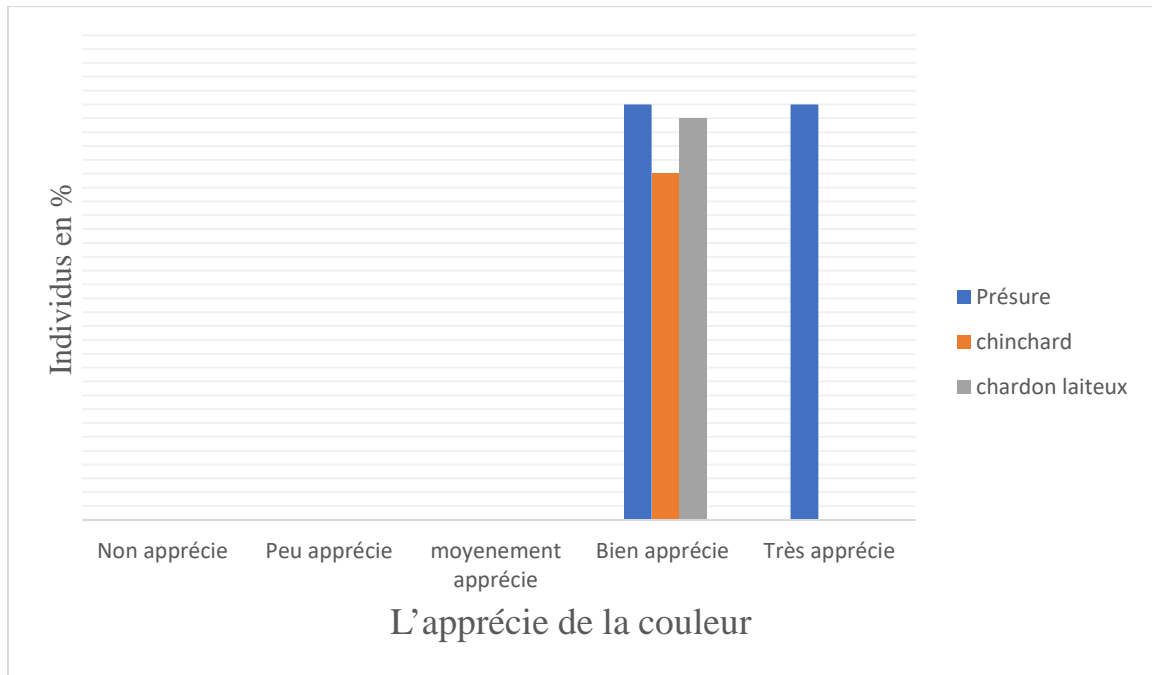
### III. Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle est la technique qui utilise les sens de l'homme pour connaître et décrire les caractéristiques organoleptiques d'un produit. Les résultats de dégustation ainsi que les préférences des trois fromages étudiés, en se basant sur les caractères suivants :

Couleur, Odeur, l'arrière-gout, Texture, aspect visuel sont donnée respectivement dans la figure suivante :



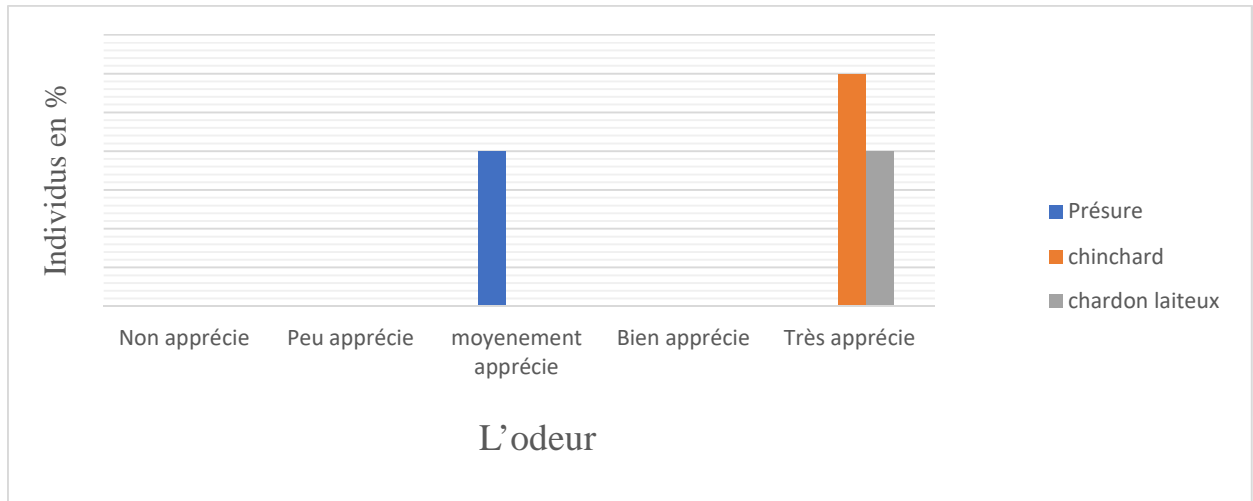
**Figure 09 :** Résultats de l'évaluation de la couleur par les dégustateurs des fromages élaborés.



**Figure 10:** Résultats de l'appréciation de la couleur par les dégustateurs des fromages élaborés.

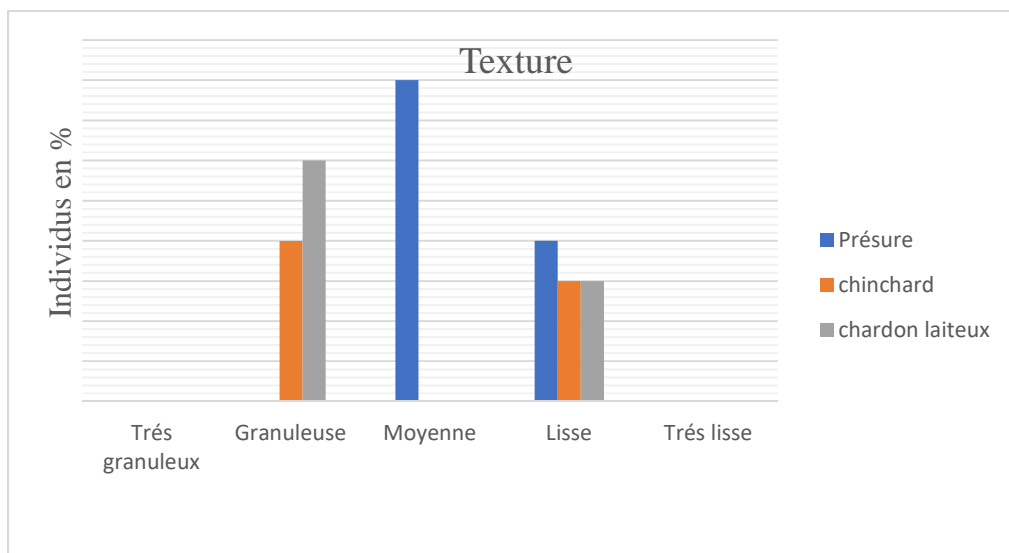
D'après les résultats obtenus, il est clair que les trois fromages présentent des points communs et des points de différences. La majorité des dégustateurs ont mentionné que les deux échantillons (chinchard et présure) ont une couleur blanche, et de couleur jaune pour l'échantillons de chardon laiteux. La couleur est bien appréciée pour les trois échantillons précédents.

Les résultats obtenus, pour le critère d'odorat assurent que l'odeur est moyennement appréciée pour présure et a une odeur légèrement forte est ressentie par certain dégustateurs vis-à-vis du fromage issu de la coagulation par l'extrait de chinchard et chardon laiteux.



**Figure 11 :** Résultats de l'évaluation de l'odorat par les dégustateurs des fromages élaborés.

La stabilité de l'arrière-gout est présente dans les trois fromages. En effet les deux fromages issus de la coagulation par l'extrait de chardon laiteux et l'extrait de chinchard sont des arrière-gouts considérés moyennement fort.

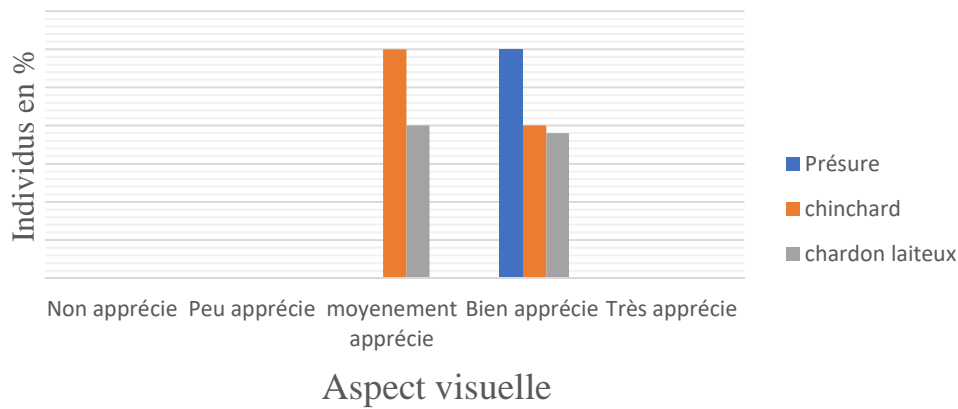


**Figure 12 :** Résultats de l'évaluation de la texture par les dégustateurs des fromages élaborés.

Pour la texture, les fromages élaborés par les extraits de chardon laiteux et de chinchard, les candidats de dégustation n'ont pas trop appréciés leur texture, qui est probablement due à la nature du caillé obtenue caractérisée par de grains de faible proportion.

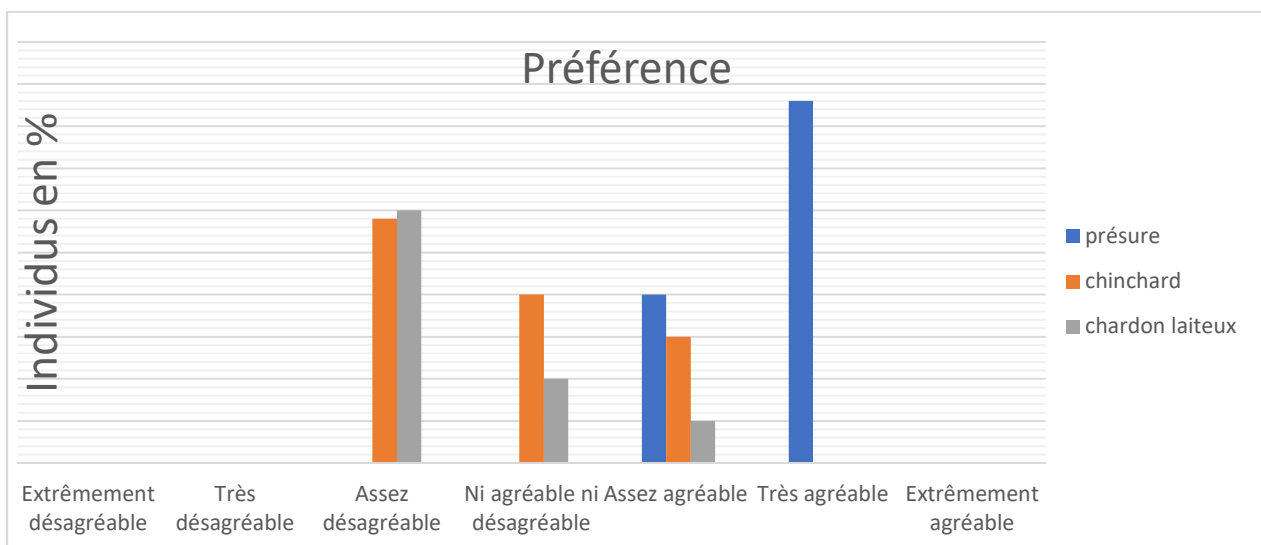


Par contre, le fromage obtenu par la présure est caractérisé par une pâte fortement granuleuse plus au moins lisse avec une texture plus ferme. En vérité, cette stabilité est due à la faible activité protéolytique que contient la présure ainsi qu'à la spécificité de son action sur les caséines.



**Figure 13 :** Résultats de l'appréciation de l'aspect par les dégustateurs des fromages élaborés.

D'après les résultats obtenus par les dégustateurs, l'aspect visuel de fromage obtenu par les deux extraits (chardon laiteux et chinchard) est moyennement apprécié par rapport à celui de la présure qui est bien apprécié.



**Figure 14:** Résultats de l'évaluation de la préférence des fromages élaborés.

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

Les extraits enzymatiques végétal et animal étudiés dans ce travail de recherche ont été caractérisés du point de vue physico-chimique, et leurs propriétés ont été évaluées en termes de teneur en protéine, activité protéolytique, force coagulante, couleur et texture.

Les résultats ont révélé que l'extrait enzymatique d'origine animale, issu de l'estomac de poisson de chinchard, présentait une teneur en protéine plus élevée ( $93,52 \pm 1,42$  mg/mL) par rapport à l'extrait enzymatique végétal issu du chardon laiteux ( $90,46 \pm 0,1$  mg/mL). Cela suggère que l'extrait animal est plus riche en protéines.

L'activité protéolytique, qui mesure la capacité des enzymes à hydrolyser les protéines, a également montré des différences significatives entre les deux extraits. L'extrait enzymatique animal avait une activité protéolytique plus élevée ( $70,4 \pm 4,4$   $\mu$ g/mL.min) par rapport à l'extrait enzymatique végétal ( $17,53 \pm 1,2$   $\mu$ g/mL.min). De plus, l'activité protéolytique spécifique était également plus élevée dans l'extrait animal ( $0,75$   $\mu$ g/mL.min) par rapport à l'extrait végétal ( $0,19$   $\mu$ g/mL.min). Ces résultats indiquent que l'extrait animal est plus efficace dans la dégradation des protéines.

En ce qui concerne la force coagulante, l'extrait enzymatique de chinchard a montré une force coagulante supérieure (3,5) par rapport à l'extrait enzymatique de chardon laiteux (1,988). Cette différence peut être attribuée à des facteurs tels que la variété, les conditions de culture et les caractéristiques environnementales.

Les conditions optimales de coagulation des extraits enzymatiques ont également été étudiées. L'activité coagulante a été évaluée en fonction de la concentration d'enzyme, de la concentration de CaCl<sub>2</sub> et du pH du lait. Les résultats ont montré que l'activité coagulante augmentait avec l'augmentation de la concentration d'enzyme, de la concentration de CaCl<sub>2</sub> et atteignait un maximum à un pH de 6,5. Ces résultats indiquent que la concentration d'enzyme, la présence de CaCl<sub>2</sub> et le pH du lait sont des facteurs importants à prendre en compte pour obtenir une coagulation efficace.

En conclusion, cette étude met en évidence les différences entre les extraits enzymatiques végétal et animal en termes de composition, activité protéolytique, force coagulante et conditions optimales de coagulation. Ces informations peuvent être utiles dans l'industrie alimentaire, notamment dans la production de fromages de qualité. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour explorer davantage les propriétés des extraits enzymatiques et leur utilisation potentielle dans d'autres domaines.

## Références bibliographique

- **AFNOR.** (1981). Produits alimentaires. Dosage des protéines. Méthode spectrophotométrique utilisant le réactif de Coomassie G 250. Norme Française, NF V03-038.
- **Alais, C.** (1974). Milk clotting enzymes. In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (Vol. 1, pp. 101-111).
- **Amimour, M. (2019).** Essais d'optimisation des procédés de fabrication des fromages traditionnels de qualité (jben et klila) (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).
- **Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P., et Simpson, R. (2002).** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. Science et technologie du lait, 1-74.
- **Bayraktar H and Önal S (2013)** Concentration and purification of  $\alpha$ -galactosidase from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning. Separation and purification technology 118:835-841.
- **Benkahoul, M., &Mechakra-Maza, A. (2016).** Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité coagulante des protéases de deux chardons endémiques, *Galactitestomentosa* et *Onopordumacanthium* (Doctoral dissertation, Université des frèresmentouriconstantine).
- **Berridge, N. J.** (1955). A rapid method for the determination of activity of rennet. *Journal of Dairy Research*, 22(2), 201-205.
- **Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- **Britten, M., et Giroux, H. J. (2022).** Rennet coagulation of heated milk : A review. *International Dairy Journal*, 124, 105179.
- **Cheftel J.C. et Cheftel H. (1977).** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Tec et doc. Lavoisier, 381p.
- **CUVELLIER, G.** (1999). New developments in cheese manufacturing processes. *Lait*, 79(1), 7-26.
- **D'Ambrosio A., Rossanos R., ungaro N. and Riccio P. (2003).** proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from the crustaceans *Munida*. *J. Mol. Catalys. B: Enzymatic* 22 :143-146.

- **Daviau C., Famelart M-H., Pierre A., Goudédranche H AndMaubois J-L., (2000).** Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Le lait* 80:397-415.
- **De Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S., et Petukhov, A. V. (2012).** Casein micelles and their internal structure. *Advances in colloid and interface science*, 171, 36-52.
- **Durand, J.-R. And J.-M. Chantraine (1982).** "L'environnement climatique des lagunes ivoiriennes." *Revue d'Hydrobiologie Tropicale* 15(2): 85-113.
- **Dussault-Chouinard, I. (2019).** Amélioration des performances fromagères des concentrés laitiers d'osmose inverse: phase de coagulation par la présure.
- **Flüeler O., And Puhanz., (1978).** *Neue Erkenntnisse über die Labträgheit der Milch. Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung* 7 :61-68.
- **Fox, P. F., Singh, T. K., et McSweeney, P. L. H. (1994).** Proteolysis in cheese during ripening. *Special Publication-Royal Society of Chemistry*, 150, 1-1.
- **Green M.L., Valler M. J. And Kay J., (1984).** Assessment of the suitability for cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin preparations. *Journal of Dairy Research*, 51: 331-340.
- **Green, T. R., & Stackpoole, S. M. (1975).** A spectrophotometric method for the measurement of tyrosine in plasma. *Clinical Chemistry*, 21(10), 1433-1436.
- **HAARD, N. F., DE STROOPER, E. A., & GIESE, J. (1980).** Proteolytic enzymes of Atlantic cod (*Gadus morhua*) stomach. *Journal of Food Science*, 45(2), 427-430
- **Horne D and Banks J (2004)** Rennet-induced coagulation of milk. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* 1:47-70.
- **Krid (2013).** Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vue d'une valorisation des proventricules de volailles au profit de la filière lait en Algérie.
- **Kumar VV, Sathyaselvabala V, Premkumar M, Vidyadevi T and Sivanesan S (2012)** Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74:63-72.
- **Lamas, J., Juárez, M., Pastoriza, L., Mato, S., & Franco, C. M. (2001).** A simplified spectrophotometric method for proteolytic activity measurement in marine extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 47(2), 151-159.

- **Lapointe-Vignola C., (2002).** Science et technologie du lait: transformation du lait, Presses inter Polytechnique.
- **Libouga, D. G., Zambou, F. N., Awah-Ndukum, J., & Choulika, E. (2006).** Partial characterization of plant coagulant proteinase from *Calotropis procera*. *Journal of Food Biochemistry*, 30(1), 51-65.
- **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- **Maachou, A. (2011).** Extraction, purification et caractérisation des enzymes digestives chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Doctoral dissertation, Université Mohammed V-Agdal).
- **Mahaut, M., Jeantet, R., & Brulé, G. (2000).** Initiation à la technologie fromagère. Editions Tec & Doc.
- **Masfufatun.,(2009).** Isolasi dan karakterisasi enzim selulase. <http://fk.uwks.ac.id/archive/journal/vol>. [12 June 2019].
- **Mechakra, A. (1999).** Contribution à l'étude des protéases d'origine animale: caractérisation, activités, propriétés biochimiques, physico-chimiques et technofonctionnelles (Doctoral dissertation, Université des Sciences et Technologies de Lille).
- **Mekhaneg, B. (2020).** Variation de la composition du lait en fonction de la race et de l'alimentation (Doctoral dissertation).
- **Mietton B., Gaucheron F., Salaun F., (2004).** Minéraux et transformations fromagères. In *Minéraux et Produits Laitiers*, GAUCHERON F (ed). Lavoisier: Paris; 471-563.
- **Moschopoulou, E., Vasilopoulou, E., & Tzia, C. (2011).** Comparative study of milk-clotting activity by microbial and calf rennet, using response surface methodology. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 200-207.
- **Najera Ai., De Renobales M., Barron Ljr(2003).** Effects of pH, temperature, CaCl<sub>2</sub> and enzyme concentrations on the rennetclotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*, **80**: 345-352.
- **Nouani, A. (2009).** Recherche de succédanés de la présure traditionnelle utilisés dans la coagulation du lait (Doctoral dissertation)

- **Özer B, Akardere E, Çelem EB AndÖnal S., (2010).** Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. *Biochemical Engineering Journal* 50:110-115.
- Ramet J. P., and Weber F. (1980). Contribution à l'étude de l'influence des facteurs de milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le lait*, 60(591-592) :1-13.
- **Ramet J.P., (1997).** Les agents de transformation du lait in *Le fromage*, 3<sup>édition</sup>, Tech. &Doc. Paris, pp: 165-172.
- **Ribeiro, L. R., Júnior, B. R. D. C. L., Tribst, A. A. L., et Cristianini, M. (2017).** Comparative study of the effect of high pressure processing on the residual activity of milk coagulants in buffer and in ultrafiltered cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 82, 1-7.
- **Robitaille G, Lapointe C, Leclerc D and Britten M., (2012).** Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropeptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. *Journal of dairy science* 95:1-8.
- **Robitaille G, Lapointe C, Leclerc D and Britten M., (2012).** Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropeptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. *Journal of dairy science* 95:1-8.
- **Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (2002).** Lipolytic enzymes produced by *Penicillium camemberti* on a cheese model medium: effect of pH. *Enzyme and microbial technology*, 31(2), 169-175.
- **Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (2002).** Review and evaluation of the techniques used in the determination of the enzymatic activity of rennet: I. Coagulometric methods. *Journal of Dairy Science*, 85(6), 1455-1476.
- **Talantikite-Kellil, S. (2015).** Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie (Doctoral dissertation, Université M'hamed Bougara de Boumerdès, Département de Tec).
- **Walsh, M. K., et Li, X. (2000).** Thermal stability of acidproteinases. *Journal of dairy research*, 67(4), 637-640.
- **Zoon P., Van Vliett T., Walstra P.,(1989).** Rheological properties of rennet- induced skim milk-gels. IV: The effect of pH and NaCl. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 43: 17-34.
-

# Annexe N°1 : Extraction animale et végétale

## Protocol de poisson

Les estomacs vidés et nettoyés

Lavés à l'eau courante

Lvés dans une solution Nac 15%

Lavés à l'eau distillé

congélation

La déconglation 25%

broyés dans une solution Acétate de sodium 1m a  
PH5

Macération pendant 3H sur un agéateur  
magnétique

Filtrés avec un papier filtre pour obtenir l'extrait  
enzymatique



Extrait placé dans des tubes  
4000 tours / 15

Le zymogène activé à pH 2 pendant 30 min en  
pépsine à l'aide d'une solution chlorhydrique à  
12%

Ajusté le pH avec le NaOH pour obtenir PH : 5

Conserver la pepsine obtenue au réfrigérateur +4°C

## Protocole de chardon laiteux

1g de poudre végétale solubilisé dans 10 ml de  
tampon phosphate ( 0,05M, pH :5,5)

Réfrigération pendant toute une nuit

Centrifugée à 15000 g 20 Min à 4°C

Récupération de surnageant

Réparte dans des eppendorfs de 2ml

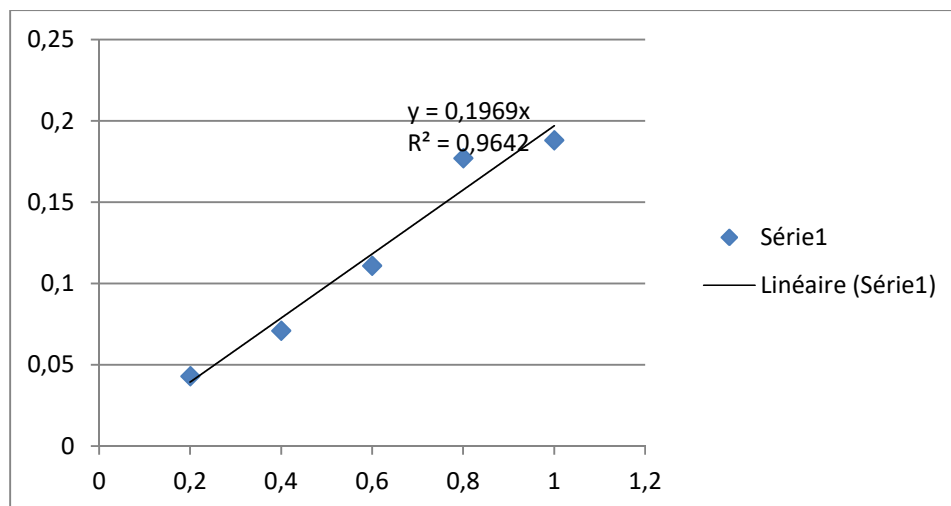
Gardé au congélateur

## Annexe N°2: MESURE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

### Courbe d'étalonnage de la tyrosine

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

**Tableau N°1** : Préparation de la gamme d'étalonnage de la Tyrosine (250µg/ml)



Courbe d'étalonnage obtenu avec la tyrosine.

### **Annexe N°3: dosage des protéines par la méthode (Bradford, 1976)**

#### **Préparation de réactif de BRADFORD**

-100mg de bleu de Coomassie G-250.

-50 ml d'éthanol à 95%.

-100 ml d'acide phosphorique à 85%.

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

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

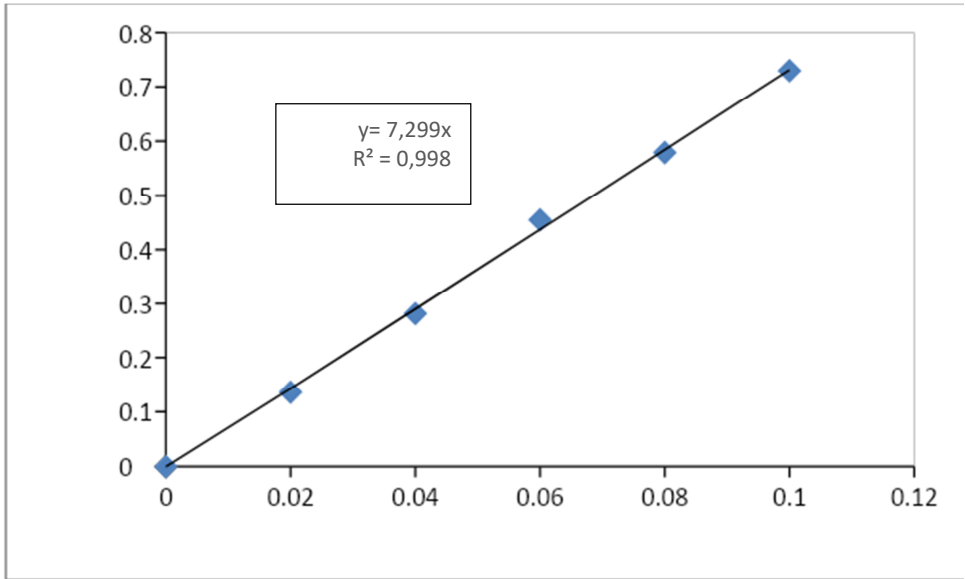
#### **Elaboration de la courbe d'étalonnage des protéines**

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) (1mg/ml) selon les quantités suivantes : 0, 100, 200, 300, 400 et 500 ml. Toutes les dilutions des solutions protéiques sont effectuées en présence de l'eau distillée. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 500ml. Après addition de 2ml du réactif de Bradford et agitation,

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

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

**Tableau N°2 : Préparation de la gamme d'étalonnage de la SAB (1mg/ml).**



## Annexe N4 : Formulaire d'analyse sensorielle hédonique d'un fromage frais

Sexe : M Ou F

N° Du Poste .....,...

Date

3 échantillons, de fromage Frais , codés vous sont présentés il vous est demandé d'évaluer les différentes caractéristiques organoleptiques en attribuant une note entre 1 et 5 selon l'échelle présentée.

Aspect visuelle :

- 1-Non Appréciée
- 2-Peu Appréciée
- 3Moyennement Appréciée
- 4-Bien Appréciée
- 5-Très, Appréciée

échantillon	A	b	c
Note			

Appréciez-vous la couleur ?

- 1-Non Appréciée
- 2 peu Appréciée
- 3-Moyennement Appréciée 4-
- Bien Appréciée
- 5-Très, Appréciée

échantillon	A	b	c
Note			

Appréciez-vous l'odeur ?

- 1-Non Appréciée
- 2-Peu Appréciée
- 3-Moyennement Appréciée
- 4- bien Appréciée
- 5-Tres Appréciée

échantillon	A	b	c
Note			

Couleur

- 1- Foncé
- 2- Moyen
- 3- clair
- 4- blanc
- 5- jeune

échantillon	A	b	c
Note			

Texture

- 1- très granuleux
- 2-granuleuse
- 3-Moyenne

échantillon	A	b	c
Note			

- 4-Lisse
- 5-Très lisse

Arrière-gout

- 1- très fort
- 2- fort
- 3-Moyen
- 4-Faible
- 5-abterit

échantillon	A	b	c
Note			

**Préférences**

Classez selon l'ordre de préférence les échantillons (A-B-C) en leur attribuant une note de 1 à 9 sachant que 1 correspond au moins préféré comme présenté dans l'échelle ci-dessous.

- 1- extrêmement désagréable
- 2- très désagréable
- 3- désagréable
- 4- Assez désagréable
- 5- ni agréable ni désagréable
- 6-Assez agréable
- 7- agréable
- 8- très agréable
- 9- extrêmement agréable

échantillon	A	b	c
Note			

Entrourez les caractéristiques qui ont motivé votre préférence

- 1- la couleur
- 2- l'odeur
- 3-la texture
- 4- le gout
- 5- le tout
- 6- autres.....

Merci pour votre coopération

# *Sommaire*

# *Introduction*



# *Partie bibliographique*

*Partie expérimentale*

## *Résultats et discussion*

# *Matériels et méthodes*

# *Conclusions*

*Références  
bibliographiques*

## Résumé

L'utilisation de protéases d'origine végétale et de pepsine d'origine animale comme succédanés de la présure a été étudiée dans le présent travail. La caractérisation physicochimique des enzymes a permis d'évaluer leur activité protéolytique, leur force coagulante ainsi que leur teneur en protéines dans les extraits enzymatiques obtenus.

Les résultats obtenus démontrent que l'extrait enzymatique d'origine animale (chanchard) présente des activités protéolytique et coagulante supérieures à celles de l'extrait végétal (chardons laitoux). Cela suggère que la pepsine pourrait être plus efficace en tant que succédané de la présure par rapport aux protéases d'origine végétale étudiées. L'effet des variables physico-chimiques du lait, telles que le pH, la température, la concentration en  $\text{CaCl}_2$  et en extrait enzymatique, sur l'activité coagulante des protéases végétales et de la pepsine animale, a également été étudié. Ces variables peuvent influencer l'efficacité de la coagulation du lait, ce qui est important dans le processus de fabrication de produits laitiers tels que le fromage.

**Mots clés :** Protéase – Pepsine – Présure – Coagulante- Succédané

## Abstract

The use of plant-based proteases and animal-derived pepsin as substitutes for rennet has been investigated in this study. The physicochemical characterization of the enzymes involved evaluating their proteolytic activity, coagulating strength, and protein content in the enzymatic extracts obtained.

The results demonstrate that the animal-derived enzymatic extract (chanchard) exhibits higher proteolytic and coagulating activities compared to the plant-based extract (milk thistle). This suggests that pepsin may be more effective as a rennet substitute than the plant-derived proteases studied.

The effect of physicochemical variables in milk, such as pH, temperature,  $\text{CaCl}_2$  concentration, and enzymatic extract concentration, on the coagulating activity of plant proteases and animal pepsin, was also studied. These variables can influence the efficiency of milk coagulation, which is crucial in the production of dairy products like cheese.

1. **Keywords:** Protease - Pepsin- Rennet –Coagulant- substitute