

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche scientifique.

Université A. Mira

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département Biologie physico-chimique



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité/Option: Pharmacotoxicologie

Thème :

Extraction, caractérisation et immobilisation de la pepsine de volaille.

Soutenu le : 13/09/2022

Présenté par :

- ❖ AMARI Rachida
- ❖ AKIL Wafa

Devant le jury

Encadreur : Mme AIT BRAHAM S.

Co-encadreur : Mr AKSAS A.

Présidente : Mme ABDELOUHAB K.

Examineur : Mr AMIROUCHE A.

Année universitaire 2021/2022

Remerciement

Je remercie en premier lieu le Clément Miséricordieux qui nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Nos sincères remerciements vont à Mme AIT BRAHAM S. et Mr AKSAS A. pour avoir accepté de nous encadrer, leurs conseils et orientations ainsi que pour la confiance qu'ils nous ont donnée tout au long de réalisation de modeste travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à Mme ABDELOUHAB K. d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury.

Il nous est agréable d'adresser nos vifs remerciements à Mr AMIROUCHE A. d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

On tient à remercier respectivement l'ingénieur de l'laboratoire physique de la faculté science de la vie et de la nature qui a largement contribué à l'aboutissement de ce travail, merci pour ton soutien technique et ta grand disponibilité, merci pour tes qualités humains qui ont rendu notre relation si agréable.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à toute personne participant de près ou de loin, en particulier Mr SIAR EL-Hocine et Mr BENRAMDAN la réalisation de ce travail.

Nous reconnaissance va également au corps enseignant du département Physico-chimique de l'université Abderrahmane mira.

Nous remercions nos camarades et nos amis pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A la femme la plus courageuse, sensible, généreuse, la plus belle à mes yeux, à celle qui a su me donner amour et joie de vivre, à celle qui a toujours montrer affection et compréhension à mon égard, à celle qui a sacrifié pour mon bien être jusqu'à le dernier souffle de sa vie,

*« Que dieu l'accueille dans ses vaste paradis »
MA Mère que j'aime.*

A celui qui a toujours été présent, qui ma a pris les vraies valeurs de la vie, à ce leu qui m'a soutenu en toute circonstances,

Mon père que j'aime.

A ma chère belle mère

A mes très chers frères et sœurs : Wissam, Aziz

A mes oncles, tantes, cousins et cousines que j'aime en particulier ma chère cousine

Nassima.

A mes très chères ami(e)s qui ont été rependus a chaque Foix que j'avais besoin d'eux en particulier : Lynda, Zahia, Nona, Adem....

A mon cher binôme Rachida

A toutes personnes donnant un coup de main et aide de près ou de loin.

A Toute la promotion pharmacotoxicologie 2021-2022



AKIL Wafa

Dédicaces

Comme tous les étudiants, un parcours d'études nous fait face à des obstacles à surpasser et des épreuves à relever, et c'est pour cela que je ne peux pas l'achever sans dédier ce travail à moi-même, je me le dédie pour ma patience, ma résistance et mon optimisme malgré toute situation.

A mon cher père qui a cru en moi, et m'a soutenu tout au long de ma vie, tu as forgé mon caractère merci d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

A ma petite maman, tu as toujours su trouver les bons mots pour me motiver, ta tendresse et ta joie de vivre m'ont accompagnée tout au long de ma vie, ce n'est qu'un fruit de tous tes sacrifices, soutiens et encouragements.

A mes petits anges Belkacem et Sabrina auquel je leur souhaite la réussite dans leurs études.

A mes chères tantes Chafia, khelidja, Hassina, Mahdia, Saliha, Fatima, merci pour votre soutien.

A mes amies de longue date Sophie, Mineur, Sabrina notre amitié est un trésor que je valorisais depuis sa première découverte, je vous dédie ce mémoire pour toutes ces années que nous avons parcourus ensemble

Ce travail est spécialement dédié pour toi mon binôme Wafa, malgré la pression le stress on est resté une seule et même personne, j'ai gagné une amie pour la vie.



AMARI RACHIDA

La liste des figures

Figure 1: Les proventricules dans l'appareil digestif du poulet	3
Figure 2: : Méthodes d'immobilisation irréversibles.....	10
Figure 3 : Exemple de microcapsules sous forme de sphère creuse et de sphère.....	11
Figure 4 : Immobilisation d'enzymes (représentées par B) par a) réticulation avec elle-même et b) co-réticulation avec un co-réticulant (représenté par C),. tiré de la référence.....	12
Figure 5 : Immobilisation des enzymes par le procédé sol-gel.	14
Figure 6 : Courbes étalons obtenues avec BSA	25
Figure 7 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de pepsine volaille.	29
Figure 8 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la pepsine volaille.	30

La liste des Tableaux

Tableau 1 Compositions générale du lait en g p. 100 mL	4
Tableau 2 : Composition moyenne de la micelle de caséine g/100g	4
Tableau 3 Principales caractéristiques des caséines d'après.....	5
Tableau 4 : Les résultats de l'activité et la force coagulante des différents extraits enzymatiques.....	28

Liste des abréviations

BSA : Albumine sérum bovin

CLEAs : cross-linked enzyme aggregates.

CLECs : cross-linked enzyme crystals.

CLEs : cross-linked dissolved enzymes.

CLSDs : cross-linked spray dried enzymes.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction	01
--------------------	----

Chapitre 1 : Etude bibliographique

1	Généralité sur la pepsine :	2
1.1	La pepsine du poulet :	2
1.2	Proventricules du poulet :	2
2	Généralités sur le lait	3
2.1	Définition	3
2.2	Composition	3
2.3	Caséines	4
2.3.1	Fractions caséiniques :	4
2.3.2	Micelle de caséine	6
2.4	Coagulation du lait	6
2.4.1	La coagulation :	Erreur ! Signet non défini.
2.4.2	Aptitude du lait à la coagulation	6
2.4.3	Mécanisme de la coagulation	6
3	Généralité sur l'immobilisation	8
3.1	Définition de l'immobilisation :	8
3.2	Historique sur l'immobilisation :	8
3.3	Les différentes techniques de l'immobilisation	8
3.3.1	L'adsorption :	8
3.3.2	Liaison covalente :	10
3.3.3	Le piégeage	10
3.3.4	L'encapsulation	11
3.3.5	L'inclusion	11
3.3.6	Réticulation	11
3.4	Procédé sol gel :	13
3.4.1	Mécanisme réactionnel :	14
3.4.2	Paramètres influençant la cinétique sol-gel :	17
3.4.3	Avantages :	17
3.4.4	Inconvénients :	18

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

1	Matériels et méthodes :.....	19
1.1	Matériels.....	19
1.1.1	Verrerie et appareils :.....	19
1.1.2	Produits chimiques :.....	20
1.1.3	Matières premières :.....	20
1.2	Méthode.....	20
1.2.1	Extraction de la pepsine à partir de proventricules de poulet :.....	20
1.2.2	Caractérisation de l'extrait enzymatique :.....	21
	Teneur en protéines :.....	23
1.2.3	Immobilisation de la pepsine :.....	25
1	Résultats et discussions	27
1.1	Extraction de la pepsine de poulet.....	27
1.1.1	Rendement de l'extraction.....	27
1.2	Propriétés coagulantes de la pepsine de poulet :.....	27
1.2.1	pH de l'extrait brut de la pepsine :.....	27
1.2.2	Immobilisation et caractérisation de la pepsine et pepsinogène Erreur ! Signet non défini.	
1.2.3	Présentation l'activité et la force coagulante des déférentes extraits enzymatique :.....	28
1.2.4	Conditions optimales de coagulation.....	29
	Conclusion	73
	Références bibliographiques	76

Introduction

Introduction

Au cours des dernières années, la demande d'utilisation d'enzymes augmente de plus en plus dans plusieurs processus chimiques en raison de leur capacité à favoriser les réactions plus rapidement et plus efficacement (**Gabriel Ramos Ferreira Gonçalves et al, 2021**).

En effet la biocatalyse représente l'utilisation de catalyseurs naturels, comme les enzymes dans une réaction de synthèse organique (**Pelmont J 1995**).

Les lipases sont parmi les hydrolases les plus utilisées en biocatalyse suite à leur grande spécificité à de nombreux substrats, la divergence des applications, a montré que ces dernières sont largement employées dans divers secteurs industriels.

Effectivement de nombreuses enzymes d'origine animale ont fait l'objet d'expérimentation dans le secteur industriel tel que la pepsine qui est connue depuis longtemps comme une enzyme digestive libérée dans l'estomac après l'ingestion des aliments, sa fonction principale est de transformer les substances albumines en substances solubles endosmotiques assimilables (**P. Evans et al,2007**).

Malheureusement, les coûts élevés, le manque de stabilité et la difficulté d'extraction de ces dernières ont poussées les chercheurs à s'orienter vers la création et l'amélioration des stratégies d'immobilisation.

L'immobilisation est une ancienne technique qui a trouvé son application ces dernières années et qui est devenue une exigence pour l'utilisation de la plupart des enzymes. Elle est définie comme la restriction de molécules enzymatiques sur un support de manière à ce qu'elle conserve son activité, elle peut adapter les caractéristiques catalytiques comme la recyclabilité, la stabilité sous différents pH, la sélectivité et la résistance aux inhibiteurs.

Les deux manières les plus courantes pour immobiliser une enzyme sont les méthodes physiques telles que l'adsorption, le piégeage et les méthodes chimiques telles que la réticulation et la fixation covalente (**Hamidreza Aghaei et al, 2022**).

Pour notre étude, on s'est intéressées au procédé sol-gel qui est une méthode relativement peu coûteuse, simple utilisée et très diversifiée Elle permet d'élaborer différents matériaux d'une grande pureté et d'une bonne homogénéité sous diverses formes (films, gels, poudres, monolithes,...). L'objectif de ce travail sera d'extraire et de caractériser la pepsine de volaille et l'immobilisée par le procédé sol-gel.

Etude bibliographique

1 Généralité sur la pepsine :

1.1 La pepsine

La pepsine est extraite de l'estomac des mammifères adultes ou des proventricules de volailles. Elle hydrolyse la plupart des protéines naturelles telles que la caséine, la globuline, et certaines enzymes telles que la trypsine, la papaïne et les amylases. Elle attaque préférentiellement les peptides contenant de la L-Phénylalanine ou de la L-Tyrosine et plus généralement les acides aminés à noyau aromatique (**Yamamoto, 1975**).

1.2 Pepsine du poulet :

La pepsine de poulet est une enzyme extraite à partir des proventricules de poulet (*Gallus gallus*) considérés comme un sous-produit d'abattage. Ces organes de longueur moyenne de 3 cm, situé au-dessus du gésier recouvert d'une couche d'épithélium formé de cellules cylindriques visibles à l'œil nu. Ces cellules sont responsables de la sécrétion de pepsinogène et de l'acide chlorhydrique (**Alamareot, 1982**).

La pepsine de poulet est sensible aux changements de pH, son optimal d'activité se situe entre 1,5 et 4,5. Elle est active à 90% à pH 1,5 et augmente avec l'augmentation du pH et atteint 35% de son activité maximale à pH 4,5, et elle reste stable à pH 8 et complètement inactivé au-delà de pH 8,5(**Bohak, 1969**), elle Peut être stockée durant 24 heures à 37° et une semaine à 4°C (**Donta et Van Vukis, 1970**).

1.3 Proventricules du poulet :

Le proventricule connu sous le nom de l'estomac glandulaire, est situé légèrement a gauche de la cavité abdominale (**Alamargot, 1982**), c'est ici que l'enzyme pepsine gastrique et l'acide chlorhydrique sont produits (**Donald et al, 1972**).

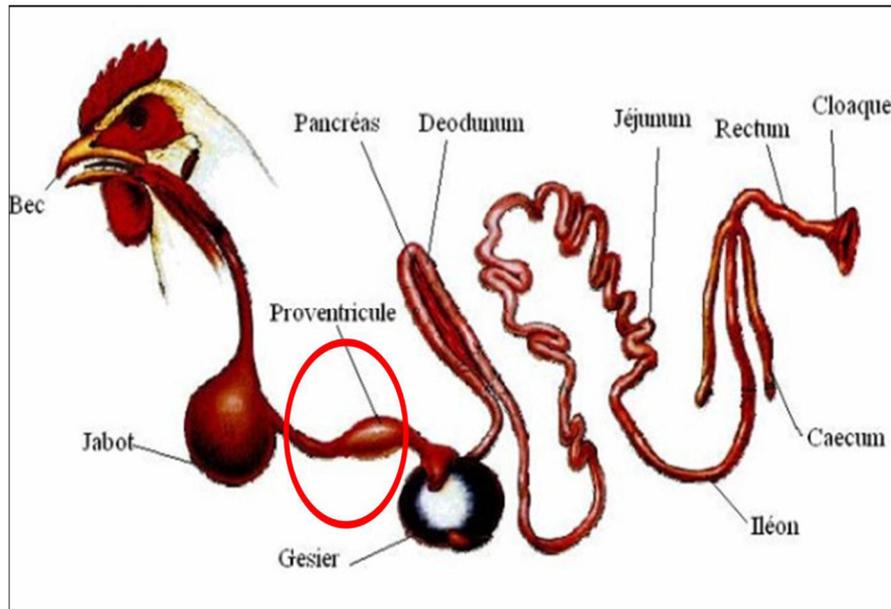


Figure 1: Les proventricules dans l'appareil digestif du poulet (Larbier et Leclercq, 1992).

La pepsine dégrade les protéines du bol alimentaire en hydrolysant les liaisons peptidiques avant les acides aminés aromatiques et hydrophobes. Cette dégradation constitue l'initiation de la digestion des protéines au niveau de l'estomac. Celle-ci sera complétée par d'autres peptidases dans les segments suivants du tube digestif.

Les enzymes coagulants le lait d'origine animale sont des protéases gastriques, telle que la pepsine, par son action sur la protéine du lait qu'est la caséine.

2 Généralités sur le lait

2.1 Définition du lait :

Le lait est sécrété par les glandes mammaires des femelles de mammifères, c'est un liquide opaque, blanc, mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en matière grasse, d'une saveur légèrement sucrée, d'une odeur peu marquée mais reconnaissable et d'un pH (6,6 à 6,8) proche de la neutralité (Hadj abd Rahman, 2014).

2.2 Composition du lait :

Le lait est un produit d'origine biologique qui peut être fortement altéré par des moyens microbiens et enzymatiques, c'est un milieu multiphasique : une phase aqueuse contenant majoritairement du lactose, des minéraux, une phase dispersée de nature lipidique (globules gras) et une phase de nature protéique (micelles de caséine), cette composition varie en

fonction de différents facteurs liés aux animaux. Principalement la race, la lactation, l'alimentation, la saison et l'âge (**Fredot, 2005**).

Ces éléments majeurs sont présentés dans le tableau 1.

Composants majeurs	Valeur moyenne
Eau	87,5
Matières grasses	3,7
Protéines	3,2
Glucides	4,6
Minéraux	0,9

Tableau 1 : compositions générale du lait en g p. 100 mL (**Vignola, 2002**).

2.3 Caséines

2.3.1 Fractions caséiniques :

Les caséines forment près de 80% des protéines du lait, et se regroupent sous une forme sphérique appelée micelle (**Alais, 1974 ; Ribadeau-Dumas, 1991 ; Mathieu, 1998**).

La caséine entière est composée de quatre constituants majeurs les caséines α_1 , α_2 , β , κ et certains composés mineurs tels que la caséine γ (**Schmidt, 1977**).

Caséines	Composants salins
α_135.6	Calcium.....2.87
α_29.9	Magnésium.....0.11
β33.6	Phosphate inorganique.....2.89
κ11.9	Citrate.....0.40
γ2.3	Sodium.....0.11
	Potassium.....0.26
Total caséines.....93.3	Total composants salins.....6.6

Tableau 2 : Composition moyenne de la micelle de caséine g/100g (**Schmidt, 1977**).

Toutes les caséines sont des phosphoprotéines de 150 à 200 acides aminés, possédant des groupements phosphates unis à la chaîne latérale de la sérine (groupe phosphoséryl) **(Cayot et Lorient, 1998)**.

Les sites phosphoséryls ne se répartissent pas uniformément tout au long de l'enchaînement, mais sont groupés dans certaines régions qui, de ce fait, sont les moins hydrophobes et les plus chargées négativement, la présence de groupements phosphoséryls confère aux caséines une très grande affinité vis-à-vis du calcium et du magnésium **(Brulé et Lenoir, 1997)**.

Les groupements acides des résidus glutamyl, aspartyl et phosphoséryl plus nombreux que les fonctions $-NH_2$ de la lysine et des autres acides aminés basiques, confèrent à la caséine entière un point isoélectrique de 4.65, une charge nette négative importante au pH du lait frais normal avec des propriétés acides **(Mathieu, 1998)**.

En solution, les caséines adoptent une conformation ouverte par rapport aux structures plus compactes des protéines globulaires, par conséquent, les nombreux groupements hydrophobes que possèdent les caséines seront plus exposés que chez les protéines globulaires, ce qui explique leur forte tendance à l'association. **(Fox, 1989)**.

Tableau 3 : Principales caractéristiques des caséines d'après. **(Fox, 1989)**.

	$\alpha s1$ ($\alpha s0, 1$)	$\alpha s2$ ($\alpha s2, 3,4,6$)	B	κ ($\kappa1$ à $\kappa7$)
Résidu d'acide aminé/mole)	199	207	209	169
Poids moléculaire (Dalton)	23600	25200	24000	19000
Résidus cystéine	0	2	0	2
Groupements phosphoséryls	8-9	10-13	4-5	1
Groupements glycosylés	0	0	0	0 à 5
Groupements hydrophobes	88	69	111	88
Charge à pH 6.6	-20.9	-14.8	-12.3	-3.0
Sensibilité au calcium	++	+++	+	-

2.3.2 Micelle de caséine :

La micelle de caséine est une particule de taille variant de 100 à 500 nm avec un diamètre moyen de 180 nm, elle est formée par l'association des caséines α_1 , α_2 , β , κ et de quelques fragments peptidiques les caséines γ (issus de la protéolyse de la caséine β) et de composants salins dont le calcium et le phosphate, Son poids moléculaire moyen est de l'ordre de 108Da et renferme entre 20 000 et 150 000 molécules de caséine (**Alais, 1974 ; Fox 2000 ; Amiot *et al.*, 2002**)

2.4 Coagulation du lait :

La coagulation correspond aux modifications physicochimiques des micelles de la caséine sous l'actions enzymatique protéolytique et/ou d'acides lactique ce qui aboutis a la formation d'un coagulum (**Jeantet *et al.*,2008**).

2.4.1 Aptitude du lait à la coagulation

La capacité de coagulation du lait est due à l'action de la présure, qui fournit un caillé aux propriétés rhéologiques précises qui ne se perdent pas lors de la décharge, certains laits caillent lentement, formant un gel mou qui s'émiette facilement, créant des caillés humides incontrôlables (**Lenoir et Schneid, 1997**).

Les moyens de contrôle sont généralement le temps de prise, la vitesse de prise du gel, son degré de prise maximal, et enfin la vitesse et le degré de synérèse, la capacité de coagulation du lait dépend de certaines propriétés, telles que la composition chimique du lait, notamment sa richesse en caséine et sa taille et la composition minérale du lait (faibles rapports (Ca/N et P/N) (**Alais, 1974**).

2.4.2 Mécanisme de la coagulation

La coagulation du lait par des protéases acides se fait en deux étapes distinctes, l'une enzymatique et l'autre non enzymatique.

2.4.2.1 Etape enzymatique (Hydrolyse de la κ Caséine) :

L'étape principale de la coagulation est l'étape enzymatique au cours de laquelle les protéases attaquent la liaison phe105-Met106 de la caséine κ , ce clivage entraîne une perturbation des propriétés stabilisatrices de la caséine κ par libération de Glycomacropéptide. (**Alais , 1974 ; Dalglish 1982, 1997**).

La paracaséine κ reste attachée aux micelles, qui ont perdu leurs pôles hydrophiles stables ce qui entraîne la coagulation, lorsque le lait coagule à un pH donné et à des niveaux de protéines normaux, la viscosité n'augmente que lorsque l'étape enzymatique est terminée à 80-85 %, soit environ 60 % du temps de floculation visible (**Cheftel *et al.*, 1985 ; Lenoir et Veisseyere, 1987 ; Mickael Eskin, 1990**).

La phase primaire de la coagulation dépend essentiellement du pH, de la température, de la force ionique, et des différents traitements subits par le lait (**MacKinlay et Wake, 1971**).

2.4.2.2 Etape non enzymatique (phase d'agrégation)

La phase secondaire est la phase de floculation, non enzymatique et dépend strictement de Ca^{2+} et du phosphate de calcium colloïdal (**Fox ,1982**). Durant la phase secondaire, les micelles de caséine se regroupent en présence de Ca^{2+} , cette agrégation se produit avant l'apparition visible de la floculation (**Alais, 1974 ; Guthy et Novak, 1977 ; Dalglish, 1982 ,1997 ; Lucey, 2002a**).

Lorsqu'une proportion suffisante de la κ caséine est hydrolysée, le potentiel électrocinétique et le degré d'hydratation des micelles sont réduits. Les forces qui empêchaient primitivement le rapprochement de celles-ci sont affaiblies et la diminution de la couche périphérique d'eau d'hydratation permet l'établissement de liaisons nouvelles, provoquant l'agrégation des micelles et la formation du coagulum (**Lenoir et Veisseyere, 1987**).

Au début de l'agrégation, le réseau protéique du gel est constitué de courtes chaînes, les particules de caséine interconnectées fusionnent et forment des amas, des grappes et finalement un réseau spongieux (**Fox et Mulvihill 1990 ;Cayot et Lorient, 1998 ; Lucey, 2002b ; 2003**).

Lorsque la présure est ajoutée à des températures inférieures à 15°C, aucune agrégation ne se produit, ce qui suggère l'importance des liaisons hydrophobes lors de la formation du gel (**Dalglish, 1997 ;Lucey, 2003**).

Le résultat de la coagulation est un réseau 3D de mailles très lâches qui piègent le lactosérum (**Lenoir et Veisseyre, 1987**). L'augmentation de la température de 31°C à 40°C multiplie par plus de 5 le taux de précipitation de la caséine (**Kay *et al.*, 1977; Dalglish, 1982**). Une diminution du pH de 6,8 à 6,3 accélère l'agrégation des micelles de caséine (**Kowalchyk, 1977 ; Dalglish, 1982**).

3 Généralité sur l'immobilisation

3.1 Définition de l'immobilisation :

L'immobilisation d'enzymes est une méthode d'adhésion de molécules enzymatiques sur un support solide insoluble dans le but d'améliorer leurs performances, le mouvement des enzymes dans l'espace d'immobilisation peut être entièrement limité ou emprisonnée dans un petit espace(Lim Wen Yao et al, 2022).L'enzyme immobilisée à de meilleurs performances en termes de stabilité thermique et opérationnelle, une plus grande tolérance dans des conditions extrêmes de pH, une plus grande facilité de séparation enzymatique, et une réutilisation donc un couts réduits par rapports aux enzymes libres (Lim Wen Yao et al, 2022).

3.2 Historique sur l'immobilisation :

L'immobilisation d'enzyme a d'abord été introduite pour permettre la réutilisation d'enzymes couteuses, vers les années 1950, plusieurs groupes ont commencé a immobiliser des enzymes sur différents supports, Menecke a été l'un des premiers a réussir a fabriquer des systèmes de protéines immobilisées relativement stables sur des supports polymères. Les premières applications industrielles des enzymes immobilisées ont été dans la production d'acides aminés optiquement purs et l'hydrolyse de la pénicilline G, depuis, de nombreuses recherche ont été menées (NemanjaMiletic et al, 2011).

3.3 Les déférentes technique de l'immobilisation

Lorsque l'enzyme est fixée au matériau d'immobilisation par des interactions ioniques, des forces hydrophobes ou des liaisons disulfure, l'immobilisation résultante sera réversible, l'enzyme et le support peuvent être dissociés dans des conditions spécifiques, mais lorsque l'enzyme et le support sont liés par des liaisons covalentes, piégeage, encapsulation, réticulation, l'immobilisation est irréversible (S Zahirinejad et al, 2021).

3.3.1 L'adsorption :

L'adsorption des protéines en général, et des enzymes en particulier, a été l'une des premières méthodes d'immobilisation développées (Messing, 1976 ; Woodward, 1985). On peut cependant distinguer les types d'interactions suivantes :

3.3.1.1 L'adsorption physique

Est l'une des techniques les plus courantes et les plus simples (**Lim Wen Yao et al, 2022**), c'est une méthode qui peut être réalisée dans des conditions douces pour minimiser la destruction de l'enzyme (**Samira Tizchang et al, 2021**), elle implique la fixation physique des molécules d'enzymes sur la surface du support par des forces intermoléculaires faibles comme Van Waals, interactions ioniques, liaisons hydrogène etc..(**Lim Wen Yao et al, 2022**).

Le protocole est assez simple, le support est immergé dans une solution enzymatique et agité, les enzymes non fixées sont éliminées par rinçage avec un tampon (**Spasojevic et al, 2019**).

Le processus d'immobilisation de l'enzyme peut choisir une variété de matériaux de support, tels que des matériaux organiques, inorganiques, hybrides et composites, tels que le chitosane, les billes de polyacrylonitrile, les argiles, le kaolin et les oxydes métalliques (**Lim Wen Yao et al, 2022**).

3.3.1.2 L'adsorption hydrophobe :

C'est une technique basée sur l'affinité des domaines hydrophobes de la protéine au support solide ayant des propriétés similaires (**Cao, 2006**). Les zones qui présentent une densité d'acides aminés hydrophobes relativement élevée interagissent évidemment avec des supports présentant le même caractère (**Brena et Batista-Viera, 1997**).

3.3.1.3 L'adsorption par affinité

Ce type de liaison entre l'enzyme et le support est obtenue de deux façons : soit le support est pré-couplé à un ligand qui présente une affinité pour l'enzyme cible, soit l'enzyme est conjuguée à une entité qui développe de l'affinité vers le support (**Mohamed et al, 2015**).

3.3.1.4 L'adsorption ionique

Outre les sites hydrophiles et hydrophobes, les acides aminés portent également des groupes chargés comme les acides carboxyliques, le glutamate et l'aspartate sont des exemples d'acides aminés chargés négativement au pH physiologique, tandis que l'arginine et la lysine sont positives dans les mêmes conditions (**Betts et Russell, 2003**).

En fonction du pH, ces groupes chargés peuvent être déployés pour immobiliser la protéine sur, par exemple, des résines échangeuses d'ions portant des groupes à contre-charge,

l'immobilisation par cette méthode peut donner des liaisons fortes (Pessela et al, 2003a ; Pessela et al, 2005).

3.3.2 Liaison covalente :

La liaison covalente entre l'enzyme et le support utilisé pour l'immobilisation est réalisée par l'intermédiaire des groupes cystéine, des fonctions thiols ou des amines primaires, ceux-ci sont connus pour leur affinité avec des matériaux comme l'or et le platine avec lesquels ils forment des liaisons covalentes (SK Jung et GS Wilson, 1996). Cette méthode d'immobilisation d'enzymes est connue sous le nom de liaisons par auto-assemblage, elle peut également être faite en utilisant une molécule de liaison entre le support et l'enzyme, cette immobilisation est plus souvent faite entre un support « activé » qui va ensuite réagir avec un groupement NH, SH, OH ou COOH de l'enzyme, le couplage a lieu généralement à des températures basses, dans un milieu ayant une force ionique basse et à un pH proche du pH optimal de l'enzyme (B. Eggins, 1996).

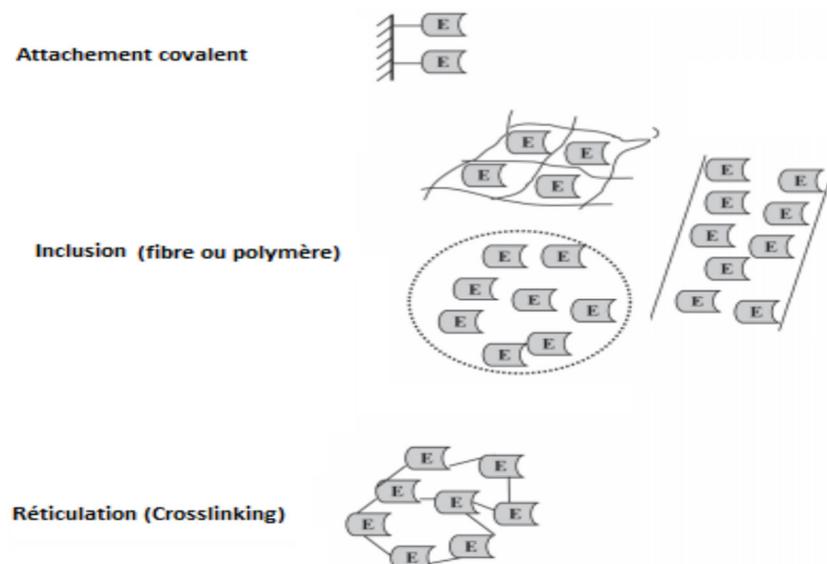


Figure 2: Méthodes d'immobilisation irréversibles (Brena et Batista-Viera, 1997).

3.3.3 Le piégeage

C'est une méthode irréversible d'immobilisation où le support n'est pas fabriqué, il est formé en présence de l'enzyme, de sorte que celle-ci est piégée à l'intérieur du support plutôt que sur celui-ci (Sheldon et Van Pelt, 2013). Toutefois, il peut se faire en utilisant deux méthodes : l'inclusion ou bien l'encapsulation (Sirisha et Jain, 2016).

3.3.4 L'encapsulation

C'est un procédé impliquant l'encapsulation des enzymes à l'intérieur des parois d'une membrane, mais elles sont dans une position flottante dans l'espace central, la capsule elle-même est semi perméable composée de nylon ou de nitrocellulose qui permet le passage du substrats de l'extérieur et maintient l'enzyme à l'intérieur, la taille des pores de la membrane est le point clé (Shivam Sharma et al, 2022).

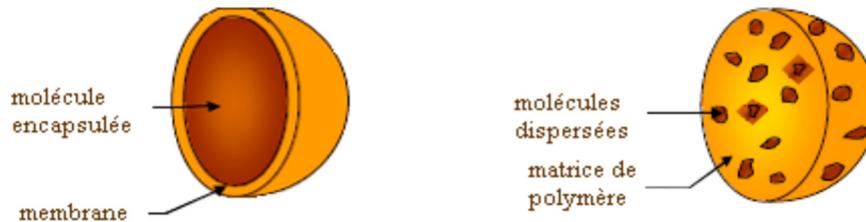


Figure 3 : Exemple de microcapsules sous forme de sphère creuse et de sphère remplie avec matrice de polymère, adapté de la référence (L. Cao, 2005).

3.3.5 L'inclusion :

C'est une méthode qui permet la dispersion d'une enzyme dans une solution homogène de monomère ou d'émulsion, dont la polymérisation du monomère entraîne la formation d'un réseau au sein duquel l'enzyme est piégée d'une manière physique (Ghasmi, 2007). Dans cette méthode, la synthèse du matériau support est faite en présence de l'enzyme dans le milieu, contrairement à l'adsorption physique, où le support est préparé avant l'étape d'immobilisation (Hronska et al, 2009).

3.3.6 Réticulation :

C'est une méthode rapide douce et rentable (Yanchun Li et al, 2015), elle représente une méthode d'immobilisation sans support attractif en raison de sa simplicité et de sa robustesse, qui est accomplie en créant une liaison covalente entre le groupe fonctionnels d'un lieu bifonctionnel et principalement les groupes amine de la surface de l'enzyme qui finit par créer une structure stable (Faezeh Ahrari et al, 2022).

Il existe deux méthodes de réticulation, soit les enzymes sont reliés entre elles par des agents réticulant de façon directe, soit en a l'aide d'agents réticulant (tel qu'une protéine inerte) qui

peut être utilisée afin de faciliter ou d'améliorer la réticulation, on parle alors de co-réticulation (Jarrar 2011).

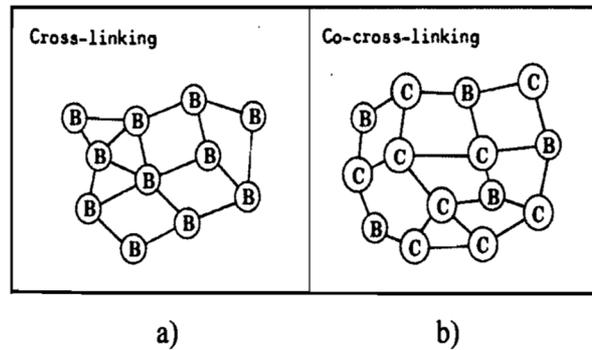


Figure 4 : Immobilisation d'enzymes (représentées par B) par a) réticulation avec elle-même et b) co-réticulation avec un co-réticulant (représenté par C)(W.Hartmeier, 1988).

Il existe différentes approches de l'immobilisation par réticulation telles que :

3.3.6.1 Les agrégats d'enzymes réticulées (cross-linked enzyme aggregates. CLEAs)

L'enzyme est d'abord précipité à partir d'une solution aqueuse en ajoutant des précipitants, tels que le sulfate d'ammonium, des solvants miscibles à l'eau, le processus de préparation CLEA nécessite un agent de réticulation, le glutaraldehyde, une petite molécule réactive capable de pénétrer la structure interne des enzymes (Jiyeon Hong et al, 2021).

3.3.6.2 Les cristaux d'enzymes réticulés (cross-linked enzyme crystals. CLECs)

Est une approche de l'immobilisation par réticulation nécessitant des enzymes pures pour que l'enzyme soit cristallisée (Kapish Gupta et al, 2015), la réticulation des cristaux d'enzyme entraîne à la fois la stabilisation et l'immobilisation sans dilution de l'activité, les cristaux d'enzymes réticulés sont préparés par le contrôle des précipitations des enzymes en microcristaux suivie d'une réticulation à l'aide de réactifs bifonctionnels pour former une liaison covalente forte entre les groupes d'acides aminés libres dans les molécules d'enzymes, les CLECs sont hautement actifs, recyclables et ont une bonne stabilité mécanique (J. Jegan Roy, T. Emilia Abraham, 2006).

3.3.6.3 Les enzymes dissoutes réticulées (cross-linked dissolved enzymes. CLEs)

Un autre type de technique d'immobilisation sans support, dans lesquelles les protéines sont liées entre elles par un liant bifonctionnel sous leurs formes en solution. La

préparation en une étape fournit une approche pour s'attaquer aux principaux inconvénients des CLECs et CLEAs en contournant le processus de cristallisation et agrégation ((FaezehAhrari et al, 2022).

3.3.6.4 Les enzymes réticulées séchées par pulvérisations (cross-linked spray-dried enzymes. CLSDs)

Les systèmes d'enzymes réticulées séchées par pulvérisation sont abandonnés au profit d'un séchage par pulvérisation qui désactive de manière réversible les enzymes (Spasojevic et al, 2019).

3.4 Procédé sol gel :

La méthode d'immobilisation par voie Sol-Gel est définie comme étant douce pour les biomolécules, elle permet la construction du gel autour de ces biomolécules, en respectant les facteurs de forme des macromolécules biologiques et en minimisant les contraintes stériques, les précurseurs moléculaires du gel peuvent s'adsorber et polymériser à la surface des biomolécules pour former un réseau inorganique, organique ou hybride autour de celles-ci, la synthèse doit être réalisée dans des conditions chimiques adéquates pour la conservation des propriétés enzymatiques, cette méthode permet la fabrication reproductible des matériaux bio-inorganiques (Fennouh Souad et al, 1999).

Les matrices de gel de silice sont très poreuses, ayant une rigidité physique, une inertie chimique et biologique, une stabilité thermique élevée et la morphologie des particules de ces matériaux sol gel peuvent être contrôlée par leur méthode de préparation (Martin Federico Desimone et al, 2008).

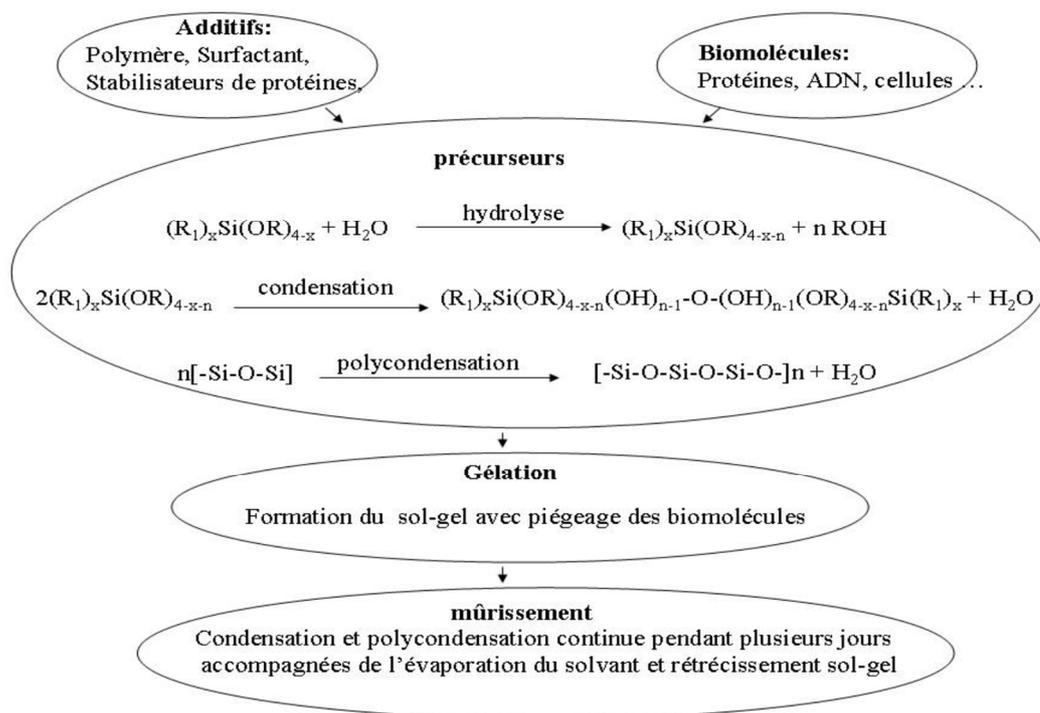


Figure 5 : Immobilisation des enzymes par le procédé sol-gel(W. Jin, J.D. Brennan, 2002)

3.4.1 Mécanisme réactionnel :

Les réactions chimiques à la base de la chimie du sol-gel sont déclenchées lorsque les précurseurs sont mis en présence d'eau (avec ou sans catalyseur), elles consistent en une hydrolyse suivie d'une condensation (C. J. Brinker and G. W. Scherer, 1990) :

3.4.1.1 L'hydrolyse :

Elle se produit grâce à une attaque nucléophile de l'atome de silicium par l'atome d'oxygène de la molécule d'eau, c'est à dire, la réaction d'hydrolyse permet la transformation suivante des groupes alcoxydes en groupes silanol (Si-OH) (C. J. Brinker and G. W. Scherer, 1990) :

3.4.1.2 La condensation :

La réaction de condensation met en jeu les groupements silanols (Si-OH), produit des liaisons siloxanes (Si-O-Si) ainsi que de l'alcool (ROH) ou de l'eau (H₂O).

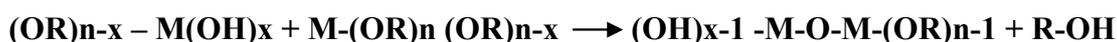
Ces réactions se poursuivent jusqu'à la disparition des groupements OH ou OR. Dans la plupart des situations, la condensation intervient avant la fin de l'hydrolyse. A cause de la non

miscibilité des précurseurs avec l'eau, on a souvent recours à un solvant (généralement de l'alcool) afin d'homogénéiser le mélange (C. J. Brinker and G. W. Scherer, 1990).

Deux mécanismes entrent alors en concurrence : l'alcoxolation et l'oxolation :

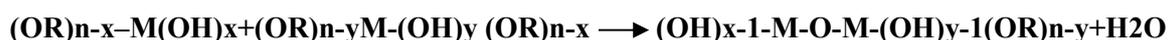
3.4.1.2.1 Alcoxolation

La réaction se produit entre deux alkoxydes métalliques dont un seulement est partiellement hydrolysé, son mécanisme réactionnel est semblable à celui de l'hydrolyse (Trabelsi, 2011).



3.4.1.2.2 Oxolation

La réaction se produit entre deux alkoxydes partiellement hydrolysés, le mécanisme reste le même si ce n'est que le groupe partant est une molécule d'eau (Trabelsi, 2011).



3.4.1.3 La transition sol-gel :

Le schéma généralement adopté pour la gélification est celui de chaînes polymériques en croissance qui s'agglomèrent par condensation et forment des amas, Au cours de l'avancement des réactions d'hydrolyse et de condensation, des amas polymériques, dont la taille croît avec le temps, sont créés, lorsque l'un de ces amas atteint une dimension infinie (c'est à dire de façon pratique la taille du récipient), la viscosité devient également infinie: c'est le point de transition sol-gel (M.Bathat, 1992).

A partir de cet instant, l'amas infini appelé « fraction gel » continue à grossir en incorporant les groupements polymériques plus petits. Lorsque toutes les liaisons ont été utilisées, le gel est formé (M.Bathat, 1992).

3.4.1.4 Vieillissement des gels :

La réaction qui entraîne la gélification ne s'arrête pas au point de gel ; elle se poursuit, l'ensemble de ce processus d'évolution du gel au cours du temps est appelé vieillissement, le vieillissement du gel se traduit par des modifications physico-chimiques qui ont lieu après la gélification

Trois processus peuvent se produire :

- la polymérisation (étape de renforcement du réseau grâce à de nouvelles liaisons)
- le mûrissement (processus de dissolution et de reprecipitation)
- la transformation de phase ou synérèse

Lorsque le gel vieillit, le phénomène de réticulation conduit au rétrécissement du matériau avec expulsion du solvant : on parle alors de « synérèse ».

Indépendamment de la synérèse, il est possible de sécher le gel, soit en conditions atmosphériques, soit en conditions supercritiques, dans les deux cas, on obtient un réseau plus ou moins dense sans solvant (**Corriu et Anh, 2011**).

3.4.1.5 Séchage des gels :

Une fois gélifié, le matériau subit le séchage dû aux forces capillaires dans les pores et ce séchage peut entraîner un rétrécissement de volume. Le procédé de séchage permettant l'obtention du matériau sol-gel nécessite que l'alcool ou l'eau puisse s'échapper en même temps que le gel se solidifie. Le procédé d'évaporation se produit grâce aux trous et aux canaux existants dans le matériau sol-gel poreux (**Trabelsi, 2011**).

Plusieurs traitements de ces solides sont possibles, tels que :

3.4.1.5.1 Séchage évaporatif

Le séchage à l'air libre entraîne l'évaporation du solvant et on obtient un gel dont la forme finale contient peu ou pas de milieu de dispersion utilisé. C'est un matériau peu poreux, voire dense appelé « xérogel » (**Trabelsi, 2011**).

3.4.1.5.2 Séchage supercritique

L'extraction du solvant se fait en contournant son point critique pour aboutir à un solide très poreux formée à partir d'un gel dans lequel le liquide est remplacé par un gaz, appelé « aérogel » (**Trabelsi, 2011**).

3.4.2 Paramètres influençant la cinétique sol-gel :

3.4.2.1 La température

C'est le premier paramètre à considérer, du fait qu'elle intervient dans toute réaction chimique. Dans le cas du procédé sol-gel, elle a une influence sur les vitesses d'hydrolyse et de condensation dès la préparation du sol (G.W. Sherer, J. Am. Ceram, 1990).

3.4.2.2 Influence du pH

En effet, les ions H_3O^+ et OH^- n'ont pas la même influence sur les deux types de réaction : le cation H_3O^+ , attiré par l'oxygène, facilite la substitution des groupes OR par OH^- (hydrolyse), tandis que l'anion OH^- , attiré par le métal M électro-négatif, privilégie la formation de liaison M-O-M (condensation), en résumé, on peut dire qu'un milieu acide favorise l'hydrolyse et conduit à la formation d'amas longitudinaux, alors qu'un milieu basique accélère la condensation et mène à des amas caractérisés par une forme sphérique, la catalyse agit donc directement sur la forme du matériau élaboré, ce facteur interviendra également de façon importante sur la porosité du matériau final, ce qui conditionnera partiellement les propriétés physiques (G.W. Sherer, J. Am. Ceram, 1990).

3.4.2.3 Le choix de l'alkoxyde et de sa concentration

Ce choix se fait en fonction de la réactivité de l'alkoxyde et du type d'échantillon que l'on veut élaborer. Quant à la concentration dans le sol, elle est surtout importante lors de la condensation, en effet, plus elle est faible, plus les molécules aptes à se lier sont éloignées les unes des autres, ce qui retarde les réactions (G.W. Sherer, J. Am. Ceram, 1990).

3.4.2.4 Le solvant

Les alkoxydes ne sont pas miscibles dans l'eau, par conséquent, il est nécessaire de mélanger les précurseurs, l'eau et éventuellement le catalyseur, dans un solvant commun. Il est alors préférable d'utiliser l'alcool correspondant au ligand – OR de l'alkoxyde, ceci afin d'éviter d'éventuelles réactions entre les différents composants du mélange susceptible de modifier les cinétiques de réactions, le sol de départ est donc généralement une solution alcoolique. (G.W. Sherer, J. Am. Ceram, 1990).

3.4.3 Avantages de procédé sol-gel :

- Amélioration de la stabilité des enzymes

- Une rétention d'activité élevée (**Lin Xue et al, 2021**).
- Une bonne biocompatibilité.
- Une surface spécifique élevée.
- La silice utilisée présente une affinité d'adsorption exceptionnelle (**Hong-Zhi Ma et al, 2016**).
- Excellente homogénéité due à la dispersion des précurseurs en solution.
- Contrôle facile de l'épaisseur et une capacité à produire des revêtements de formes complexe (**Hamd, 2009**).
- Résistance aux attaques microbiennes (**Hamdan, 2009**).

3.4.4 Inconvénients de procédé sol-gel :

- Dénaturation de l'enzyme pendant le processus de condensation et séchage.
- L'entrave de l'activité catalytique de l'enzyme à cause de la diffusion lente des molécules de substrat de l'enzyme au sein de la matrice sol gel (**Hong-Zhi Ma et al, 2016**).
- Coût des précurseurs alcoxydes élevé
- Maîtrise délicate du procédé et temps de processus longs (**Aksas, 2011**).

Matériel et méthodes

1 Matériels et méthodes :

1.1 Matériels

Dans cette partie, sont décrits le matériel, les produits utilisés, et les étapes suivis pour procéder à l'extraction, caractérisation et immobilisation de la pepsine de volaille.



1.1.1 Verrerie et appareils :

- Les mesures ont été faites à l'aide de micropipette, les solutions sont mises dans des béchers, Erlenmeyer, Eppendorf de 2mL, tube à centrifuger de 12mL.
- Les matrices sont versées dans des boîtes de Pétri stériles d'un diamètre de 6 cm.
- Le pesage a été fait à l'aide d'une balance de marque KERN EWJ.
- Le broyage a été fait avec un hachoir ménager à couteaux.
- L'agitation a été faite dans d'un agitateur de marque VELP Scientifica.
- L'incubation des échantillons a été faite dans un bain marie de marque DAIHAN Scientific.
- L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre de marque BIOTECH ENGINEERING MANAGEMENT CO.LTD.(UK).
- La centrifugation a été réalisée avec une centrifugeuse à froid de marque Centurion Scientific.



1.1.2 Produits chimiques :

Les produits utilisés lors de la préparation des solutions et des matrices de silice sont obtenus chez SIGMA-ALDRICH

- Chlorure de sodium (NaCl)
- Bicarbonate de soude (NaHCO_3).
- Albumine sérum bovin (BSA)
- La caséine
- Acide chlorhydrique (HCl).
- Hydroxyde de sodium (NaOH).
- Solution de Bradford qui sera composée de (L'acide sulfurique, bleu de Coomassie – 250, Méthanol).
- Acide trichloroacétique (TCA).
- Orthosilicate de tétraéthyle (TEOS).
- Ethanol.

1.1.3 Matières premières :

- **Les proventricules de poulet :** ont été récupérés à l'abattoir «Menad Mouhou» situé à Taharacht, Rafour commune M'Chadallah wilaya de Bouira.
- **Le lait de vache :** a été récolté à la ferme «Saidani» située à Boudjellil, Tazmalt wilaya de Bejaia.

1.2 Méthode

1.2.1 Extraction de la pepsine à partir de proventricules de poulet :

Afin de procéder à l'extraction de la pepsine, on a haché 100g de proventricules à l'aide d'un hachoir, et on a préparé le tampon de macération composé de (30g de NaCl et 7g de NaHCO_3) qu'on a dissout dans 1L d'eau distillé (**Bohak, (1970)**)



Dans 300 mL du tampon de macération on met 100g de proventricules hachés, et on laisse macérer pendant 3h sous agitation.

Après macération on filtre à l'aide d'une compresse.

Les pepsinogène récupérés sont ensuite activé par l'ajoute d'une solution d'HCL 3N (24.87ml dilué dans 100ml d'eau distillé) jusqu'à l'obtention d'un pH = 02.



On laisse reposer pendant 15minutes à température ambiante puis on centrifuge pendant 30minutes dans une centrifugeuse à froid d'une vitesse de 3200 t/nm, on récupère le surnageant clarifié et on ajuste le pH à 6,4 par une solution de NaOH 3N (12g dilué dans 100ml d'eau distillé).

La solution enzymatique est répartie en petite quantité puis congelé a -18°C .



1.2.2 Caractérisation de l'extrait enzymatique :

1.2.2.1 Etude de l'activité coagulante :

Principe : l'activité coagulante est déterminée selon la méthode de Berridge (1945), en mesurant le temps de floculation correspondant a l'intervalle entre l'ajout de l'extrait enzymatique et l'apparition des premiers flocons (**Benyahia A, et al 2013**). La technique consiste a ajoutée 1ml d'extrait coagulant brut a 10ml de substrat puis a noter le temps de coagulation a 30°C (**Siboukeur, et al 2005**).

Une unité d'activité enzymatique ou unité de présure (UP) correspond selon la formule de Berridge, au nombre d'unités de poids ou de volumes de lait qui peuvent être coagulés par 1ml de préparation coagulante en 100 secondes et a 30°C (Siboukeur, et al 2005).

$$UP = \frac{10 \times V}{Tc \times Q}$$

Ou :

UP = unité de présure.

V = volume de substrat standard utilisé.

Q = volume d'extrait coagulant.

Tc = temps de coagulation (temps de floculation).

Mode opératoire : On met un bécher contenant 5mL de lait de vache dans un bain marie réglé a 35°C puis on ajoute 0,5mL de l'extrait enzymatique, on incline légèrement le bécher tout en appliquant un mouvement d'agitation manuelle, on mesure par la suite le temps de coagulation (Siboukeur, et al 2005)

1.2.2.2 La force de coagulation :

Principe : L'activité coagulante s'exprime également par la force de coagulation (F). Donnée en unité de soxhelt (US), et correspond au nombre de volume de lait qu'un volume de préparation enzymatique peut coaguler en 40minutes (2400sec) a 35°C, pH 6,4 du substrat (lait).

Elle est calculée selon l'équation suivante :

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

Ou :

F : Force de l'enzyme (Soxhelt).

V : volume de lait (ph 6,4, T°: 35°C).

v : volume de l'extrait enzymatique.

T : temps de coagulation en secondes (2400 : 40×60 secondes) (Siboukeur, et al 2005).

Mode opératoire : on refait le protocole de l'activité coagulante sauf que les béchers sont maintenus pendant 30 minutes à 35°C au bain marie pour la stabilisation du lait. La force de coagulation correspond à l'intervalle entre l'ajout de l'extrait enzymatique et la formation de gel (coagulation du lait).

1.2.2.3 Etude de l'activité protéolytique :

Principe : l'activité protéolytique de notre extrait enzymatique est mesurée selon la méthode de Green et Stackpoole, (1975) elle permet d'évaluer la vitesse de dégradation de la caséine par les enzymes lors de la réaction primaire.

L'activité a été déterminée en mesurant la concentration d'hydrolysate de caséine soluble dans l'acide trichloracétique (TCA) à une concentration finale de 12%.

La réaction enzymatique a été arrêtée par l'ajout de TCA, suivi d'une centrifugation pour séparer le précipité de caséine et l'hydrolysate soluble (**Green M.L, et Stackpoole A (1975)**).

Mode opératoire : Avant d'entamer l'activité protéolytique, tout d'abord on procède à la dilution de la caséine et la TCA.

Pour la TCA, on dissout 10g dans de l'eau distillé puis on complète le volume jusqu'à 100mL. Pour la caséine, on prépare 1g et on ajoute de l'eau distillé jusqu'à 100mL à un pH = 07. Après avoir fini les dilutions.

Dans un bécher, on prend 1,5uL de la solution de caséine et on ajoute 150uL de l'extrait enzymatique, on l'incube à 37°C pendant 20 minutes, par la suite on ajoute la TCA et on laisse le mélange reposer à température ambiante pendant 10 minutes.

La solution est centrifugée à une force centrifuge de 3200g pendant 10 minutes, le surnageant récupéré (1mL) sera utilisé pour la suite des études.

1.2.2.4 Teneur en protéines :

Principe : Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford qui est basée sur le changement d'absorbance observé lorsqu'une solution acide de colorant Coomassie Brilliant Blue (G-250) est ajoutée à une solution de protéines (**Bonjoch, et al 2001**).

Mode opératoire : on prépare les dilutions de l'extrait enzymatique et la BSA :

Pour l'extrait enzymatique :

Les dilutions de l'extrait enzymatique			BSA	
Solution (A)	Solution (B)	Solution (C)	Solution stock	Solution mère
1ml d'enzyme	2ml de la solution (A)	1ml de la solution (B)	0,05 g de BSA	0,3 ml de la solution de stock
9ml d'eau distillé	8ml d'eau distillé	9ml d'eau distillé	25ml d'eau distillé	En complète jusqu'à 30 ml

Les dilution a partir de la solution mère :

0,02 (SM)	0,015	0,01	0,005	0
0,3ml de la solution stock	7,5ml (SM)	5mL (SM)	2,5mL (SM)	0mL
29,7 d'eau distillé	2,5 mL d'eau distillé	5mL d'eau distillé	7,5mL d'eau distillé	L'eau distillé
1 ml de Bradford				

On mesure l'absorbance a 592 nm

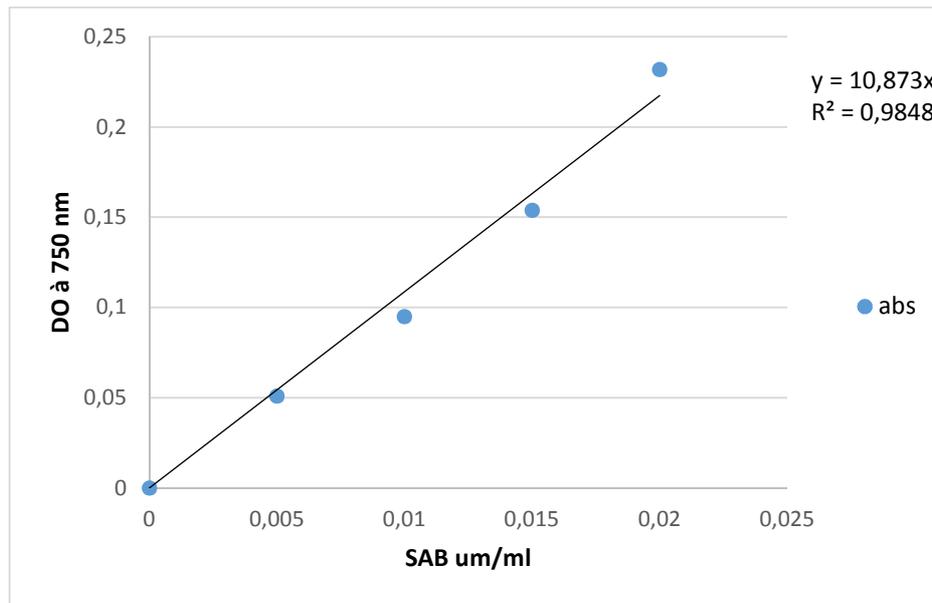


Figure 06 : Courbe étalon obtenue avec BSA

1.2.2.5 Détermination des conditions optimales d'activité de l'extrait enzymatique :

1.2.2.5.1 pH optimale :

Le pH a une forte influence sur l'activité enzymatique et par conséquent sur le temps de floculation du lait (Huppertz T, et al (2006).

On prépare plusieurs bécher contenant environ 20 mL de lait de vache, et on ajuste leurs pH à 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 par addition de HCl et NaOH (1N) puis on mesure leurs activités coagulante, la valeur final correspond a la moyenne de 3 essais.

1.2.2.5.2 Température optimale :

On prépare plusieurs bécher contenant 5 mL de lait de vache qu'on a différentes températures allant de 30°C jusqu'à 80°C (30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70 ; 80) et on mesure l'activité coagulante a chaque température, la valeur final correspond a la moyenne de 3essais.

1.2.3 Immobilisation de la pepsine :

Pour notre étude, on va utiliser le procédé sol-gel.

1.2.3.1 Préparation du gel de silice :

- On prélève un volume de TEOS

- On ajoute de l'éthanol avec un rapport volumique de [1 : 3] et on laisse le mélange sous agitation pendant 10 minutes.
- On rajoute de l'eau distillé pour déclencher l'étape d'hydrolyse.
- On additionne au mélange quelques gouttes de HCL afin de lancer la condensation et la gélification.
- On verse la solution dans des boites de pétris stériles, et on les laisse sécher.

Après 24 heures on obtient la silice :

1.2.3.2 Préparation de gel contenant la pepsine :

Nous avons procédé de la même manière que pour la préparation de la silice sauf que cette fois on remplace l'eau distillé par notre extrait enzymatique (la pepsine).

1.2.3.3 Caractérisation de la pepsine immobilisée :

On prend le monolithe contenant l'enzyme immobilisée, on le rince 3 fois avec de l'eau distillé, puis on le met dans un bécher et on ajoute environ 20 ml de lait de vache et on a incubé à 37°C, pH 6,4

1.2.3.4 Préparation de gel contenant le pepsinogène non actif :

On refait le même protocole expérimental de la préparation de gel de silice et on remplace l'eau distillé par le pepsinogène.

1.2.3.5 Caractérisation du pepsinogène immobilisé :

On prend le monolithe contenant le pepsinogène immobilisé, on le rince environ 3 fois avec de l'eau distillé, puis on le met dans un bécher et on ajoute 20 mL de lait de vache et on mesure son activité coagulante à 37°C.

Résultats et discussions

1 Résultats et discussions

1.1 Extraction de la pepsine de poulet

1.1.1 Rendement de l'extraction

Le rendement d'extraction exprimé en unité d'activité coagulante par 100g de proventricule de poulet est égale à 700 rendement correspond à l'activité enzymatique du volume total de l'extrait de pepsine de poulet clarifier obtenu après macération dans 300 mL de solution d'extraction.

1.2 Caractéristique de l'extrait de la pepsine de poulet :

L'extrait brut de pepsine de poulet obtenu après extraction est caractérisé par l'activité coagulante, la force coagulante, l'effet du pH et l'effet de la température.

1.2.1 pH de l'extrait brut de la pepsine :

Le pH obtenu après extraction est de 8,3, selon **Alamargot, (1982)**, l'extrait brut issu de proventricules de poulet est de pH $8,5 \pm 0,1$. Le résultat obtenu donne un pH de 8,64 pour l'extrait brut non actif (pepsinogène), ce résultat accorde avec nos résultats.

En effet, **Tavares et al., (1997)** ont déterminé un intervalle d'ajustement de pH des extraits enzymatiques de l'ordre de 6 à 6,9, cette valeur correspond notamment à notre ajustement du pH de pepsine à 6,4 après une activation en pepsine à pH =2.

1.2.2 La teneur en protéines

La teneur en protéines de l'extrait clarifié de pepsine de poulet obtenu est de 21,32 mg/ml.

Ce résultat est supérieur à celui obtenu par **Adoui, (2007)** qui est de 8,77 mg/ml et largement inférieur à celui obtenu par **Nouani et al.,(2011)** ayant une valeur de 147,3 mg/ml.

1.2.3 Résultats de l'activité et la force coagulante des déferents extraits enzymatiques :

Tableau 4 : résume les résultats de l'activité et la force coagulante obtenues pour l'extrait de la pepsine de poulet.

	Enzyme libre	Enzyme immobilisée	Enzyme immobilisée non activée (pepsinogène)
L'activité coagulante (UP)	2,5	0,30	0,24
La force coagulante	369,23	50	44,44

L'activité coagulante est de 2,5 UP pour l'enzyme libre, 0,30 UP pour l'enzyme immobilisée et 0,24 UP pour le pepsinogène.

L'extrait clarifié de la pepsine de poulet a une activité coagulante de 2,5 U.P. Cette activité est inférieure aux activités obtenues par **Nouaniet al., (2011)** évalué à 13,33 U.P, par **Adoui, (2007)** qui est de 15,08 U.P. et **Paez De Leonet al., (1995)** qui ont obtenu 5,52 U.P. et supérieure à celle **Boughellout, (2007)** estimé à 2,42 U.P.

On remarque une diminution l'activité de l'enzyme libre active immobilisée de 100% jusqu'à 12%, ce qui signifie que l'immobilisation a une influence sur l'activité enzymatique, la diminution est peut être due à la variation de la température, ou bien à l'auto-dégradation de l'enzyme suite à son interaction avec le HCl. Une autre hypothèse s'impose dans ce cas pour expliquer la diminution de l'activité est l'effet de support sur l'enzyme ainsi que la dimension des ports de l'enzyme (dans le cas de caséine qui est un substrat de grand poids moléculaire l'accès à l'enzyme peut être affecté pour la taille de substrat).

L'activité enzymatique du pepsinogène est de 0%, après immobilisation on a eu 0,24 UP.

L'immobilisation nous a permis d'avoir presque le même résultat que l'enzyme libre après immobilisation, et cela signifie que l'HCl a une action sur le pepsinogène.

En ce qui concerne la force coagulante les résultats varient de 369,23 pour l'enzyme libre, 50 pour l'enzyme immobilisée et 44,44 pour le pepsinogène,

En termes de force coagulante l'extrait de la pepsine que nous avons obtenue a une force de 1/369,23. Ce résultat est inférieur à celui obtenu par **Nouani et al., (2011)** évalué à 1/3200 et par **Adoui, (2007)** estimé à 1/2579.

Donc, notre étude on a constaté que l'enzyme immobilisée peut être réutilisée car il garde une partie de son activité, mais aussi que le HCl présent dans le protocole d'immobilisation favorise l'activation de la pepsine qui est une enzyme gastrique acide.

1.2.4 Conditions optimales de coagulation

Plusieurs facteurs influencent la coagulation telle que la concentration en enzymes, le pH du lait (JEANTET *et al.*, 2008).

Dans le but de déterminer les conditions physico-chimiques optimales pour l'action de l'extrait de la pepsine de poulet, nous avons essayé de voir l'influence de certains paramètres sur leur activité coagulante.

1.2.4.1 Effet de pH

L'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait de la pepsine volaille, a été étudié en ajustant le pH du lait (substrat de Berridge) aux valeurs de l'intervalle 5 à 7. La température d'incubation est fixée à 35 °C.

Le pH optimal de coagulation du lait est déterminé par observation du temps de floculation le plus court. La figure 17 donne l'évolution de l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés en fonction du pH du lait.

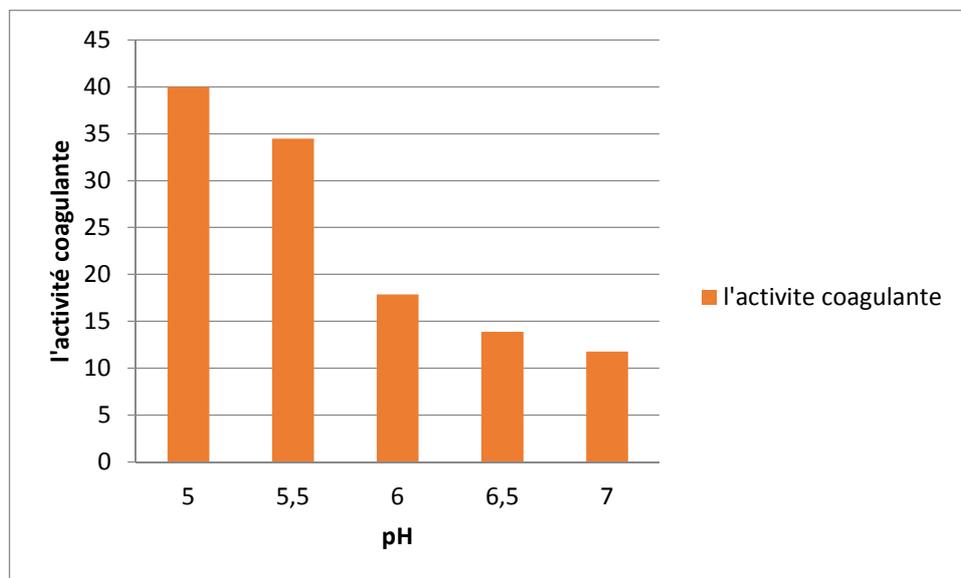


Figure 6 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait de pepsine volaille.

Les résultats présentés par la figure 17 indiquent un effet synergique, c'est à dire une diminution de l'activité coagulante des deux préparations enzymatiques au fur et à mesure que le pH du lait augmente,

En effet, l'optimum d'activité est à pH 5,0 avec une activité coagulante de 40 U.P. Cette activité passe à 17,85 U.P. à pH 6,0 pour se stabiliser à 11,76 U.P. à pH 7, pour la pepsine de volaille.

Adoui, (2007) rapporte que la pepsine de poulet est d'autant plus active que le pH est bas.

D'après ces résultats nous constatons que le pH joue un rôle très important, en effet l'extrait étudié montre un caractère acide (l'optimum d'activité à pH 5).

1.2.4.2 Effet de la température

L'effet de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique étudié est déterminé par la mesure de l'activité coagulante à différentes températures d'incubation (de 30 à 80°C).

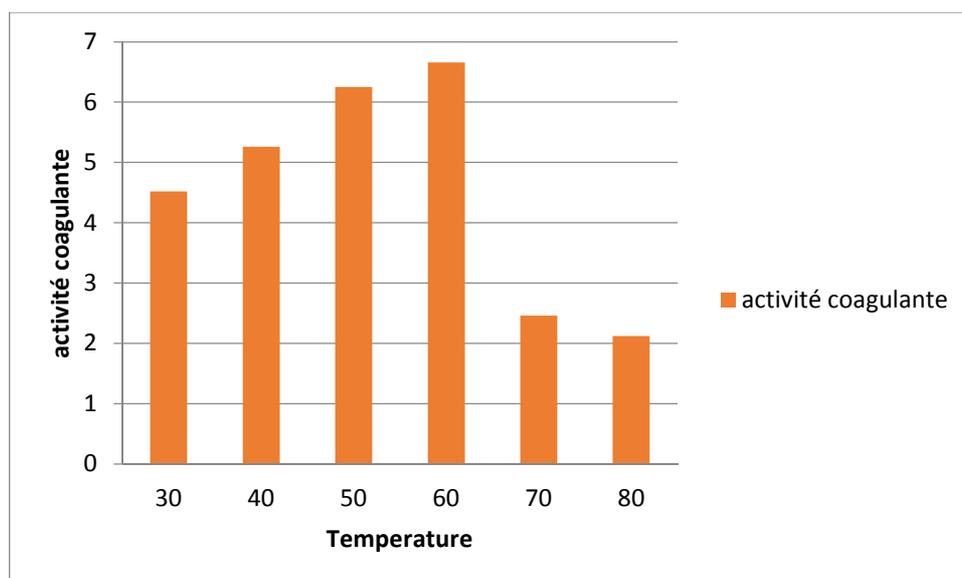


Figure 7 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la pepsine volaille.

Nous avons constaté une différence de comportement de l'extrait enzymatique suivant les températures étudiées.

L'activité optimale est enregistrée à des températures du lait égales à 50°C et 60°C avec 6,25 U.P. et 6,66 U.P. respectivement, au-delà de ces températures nous avons constaté une baisse d'activité. Les résultats obtenus pour la pepsine sont proches de ceux donnés par **Adoui**

(2007) évalué à 55°C et supérieurs aux résultats obtenus par **Nouaniet *al.*, (2011)** estimé à 40°C.

L'activité de l'extrait de pepsine diminue au-delà de 55°C. Selon **Adoui (2007)** la pepsine est inactivée aux températures dépassant 65°C. **Nouaniet *al.*, (2011)** ont signalé que la pepsine de poulet est totalement inactivée à 55°C, ce qui confirme nos résultats.

Conclusion et perspectives

Conclusion :

Ce travail est porté sur l'extraction de la pepsine à partir de proventricules de poulet et l'étude de ces propriétés coagulantes l'immobilisation de la pepsine afin de connaître la possibilité de leur valorisation dans la coagulation de lait. Pour atteindre cet objectif, nous avons été emmené à réaliser l'extraction de la pepsine de poulet à partir du proventricule et de caractériser l'extrait enzymatique obtenu.

En première étape, et à partir d'un protocole d'extraction approprié, nous avons obtenu un extrait brut. Cette préparation enzymatique a été caractérisée ensuite, par la mesure du temps de floculation, l'activité enzymatique ou UP (unité pepsine), la force, l'effet de la température, l'effet du Ph.

En deuxième étape, nous avons procédé à l'immobilisation par la méthode sol gel avec l'enzyme active et non active (pepsinogène) et on a mesuré le temps de floculation et la force coagulante.

L'extraction nous a permis d'avoir des extraits enzymatiques de pepsine de poulet immobilisée et non immobilisé dont les caractéristiques sont respectivement les suivantes :

Une activité coagulante de 2,5 U.P, une force coagulante de 1/369,23 pour l'enzyme libre et enzyme immobilisée une activité coagulante égale 0,30 U.P et une force coagulante 1/50, et en fin pour le pepsinogène une activité coagulante 0,24 U.P et une force coagulante 1/44,44.

On remarque l'enzyme libre à une activité et force coagulante supérieur a l'enzyme immobilisée, et entre enzyme activé supérieur à celle de la pepsinogène.

On constats, l'immobilisation joue un rôle important dans la coagulante du lait, il ralenti la coagulation.

Pour conclure, nous pouvons dire que les résultats obtenus semblent intéressants d'autant qu'ils montrent que l'immobilisation ralentie le temps de floculation mais l'enzyme reste toujours active, mais aussi que le HCL utilisée au cours du protocole d'immobilisation active le pepsinogène.

Cependant il est intéressant de poursuivre ce travail par :

- Optimisation du pH et la température pendant la mesure.
- Caractérisation de l'enzyme de la pepsine après immobilisation.

Références bibliographiques

Référence bibliographie

Adoui F., 2007. Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir des proventricules de poulet. Mémoire magister. Univ. Mentouri Constantine. 64p.

Ahrari, Faezeh, Yousfi, Maryam, Habibi, Zohreh, et al., 2022. Application of undecanedicarboxylic acid to prepare cross-linked enzymes (CLEs) of *Rhizomucormiehei* lipase (RML); Selective enrichment of polyunsaturated fatty acids. *Molecular Catalysis*, vol. 520, p. 112172.

Aghaei, Hamidreza, Mohammad Bagheri, Zahra, Hemasi, Amineh, et al., 2022. Efficient hydrolysis of starch by α -amylase immobilized on cloisite 30B and modified forms of cloisite 30B by adsorption and covalent methods. *Food Chemistry*, vol. 373, p. 131425

Ali, Aksas., 2011. Élaboration des nanocristaux semi-conducteurs et étude de leurs propriétés structurales et optiques.. Thèse de doctorat. Université de Béjaïa-Abderrahmane Mira.

Alamargot J., 1982. Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaires. Maisson_ Alfort : Eddu Paint Vétérinaire .136p.

Alais C., 1974. Principes des techniques laitières : science du lait. Ed : Publicité, Paris. 513 p.

Aminot J., Fournier S., Lebeuf Y, Paquin P., et Simpson R., 2002. Composition, propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait in *Sciences et technologies du lait*. Ecole polytechnique de Montréal. pp .1-69.

Benaïcha et Sahi., 2009. Influence de la race sur la composition du lait bovin. Essai de fabrication d'un fromage avec un succédané de présure (pepsine ovine). *Mém. Ing. Agr., Ecole Nationale Supérieure Agronomique El Harach (Alger)*, p.p.79-141.

Betts M. J, Russell R. B., 2003. Amino acid properties and consequences of substitutions. In M. R. Barnes, I. C. Gray (Eds.), *Bioinformatics for Geneticists*. 291-314.

Benyahia A, Attia H, Zidoune M., 2013. Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet : Interactions and microstructure. *Journal of agriculture, Biotechnology and Ecology*, 3 : 75-86

Brena B.M, Batista-Viera F., 1997. Immobilization of Enzymes A Literature Survey in *From: Guisan J.M. Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition Humana Press Inc., Totowa.*

B. Eggins., 1996. Biosensors: An Introduction. Toronto: Wiley-Teubner. p. 212.

Bohak Z., 1969. Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *Journal Biological Chemistry*, Vol. 244, N :17, : 4638-4648.

Bohak, Z., 1970. Chicken pepsinogen and chicken pepsin. In: *Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes*. Ed., G. E. Perlmann and L. Lorand, Acad. Press Inc., New York, V. 19, p.347-358, 1042 p

Boughellout H., 2007. Coagulation du lait par la pepsine du poulet. Mémoire magister, université Mentouri Constantine, 69p.

Bonjoch, Nuria Pedrol et Tamayo, Pilar Ramos., 2001. Protein content quantification by Bradford method. In : *Handbook of plant ecophysiology techniques*. Springer, Dordrecht, 2001. p. 283-295.

Brule G., Lenoir J. ET Remeuf F.,1997. La micelle de caséine et la coagulation du lait, In : Le fromage. Ed. A. Eck, et Gillis J.C. (coordonnateurs), pp 7-41, 3ème édition, Lavoisier Tec & et Doc. Paris 891 p

Berridge N.J., 1955. Purification and assay of rennin. Methods in enzymology. Ed. Perlmann G.E. and Lorand L., Acad. Press Inc., New York. Vol. 2. 69-77

Cayot P. et Lorient D.,1998. Structures et technofonctions des protéines du lait. Arilait Recherches, Lavoisier Tec. et Doc. 363 p.

Cao L. 2006. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. : John Wiley & Sons.

L. Cao. 2005. *Carrier-Bound Immobilized Enzymes - Principles, Applications and Design*, ed. J.W. Sons., Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co p600.

Cheftel J.-C., Cuq J. L. et Lorient D.,1985. Protéines alimentaires : Biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle et modifications chimiques. Tec et Doc. Lavoisier.

Corriu R., Anh N.T (2011). Chimie moléculaire, sol-gel et nanomatériaux. Ecole polytechnique, Paris Tech, p. 52-62.

Creveu-gabriel I., Gomez J., Caffin J-P., Carre B., 1999. Comparison of pig and chicken pepsins for protein hydrolysis. Nutr. Dev. 39. 443-454.

C. J. Brinker and G. W. Scherer.,1999. Sol-Gel Science, The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing H. B. Jovanovich, San Diego

Dalgleish D.G.,1997. The Enzymatic coagulation of milk. in Advanced Dairy Chemistry V1 Proteins. P.F. Fox Blackie and son Ltd. P579-619

Dalgleish D.G.,1982. The Enzymatic coagulation of milk in Developpements in Dairy Chemistry-1 Proteins. P.F. Fox Applied Science Publishers p157-186

Desimone, Martín Federico, Matiacevich, Silvia Beatriz, Del Pilar Buera, María, et al.,2008. Effects of relative humidity on enzyme activity immobilized in sol-gel-derived silicane nanocomposites. Enzyme and microbial technology, , vol. 42, no 7, p. 583-588.

Donta S.T. and Van Vunakis H.,1970. Chicken pepsinogens in Methods in enzymology, Proteolytic Enzymes. Ed., Perlmann G.E. and Lorand L., Acad. Press Inc., New York Volume 19, pp 358-363, 1042 P.

Fennouh, Souad, Guyon, Stéphanie, Catherine, Jourdat, et al., 1999. Encapsulation of bacteria in silica gels. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIC-Chemistry, vol. 2, no 11-13, p. 625-630

Foxpatrick f., Guinee timothy p., Timothy m., Cogan et McSweeney paul L. H.,2000. Fundamentals of Cheese Science. AN ASPEN PUBLICATION Inc. Gaithersburg, Maryland. P 559.

Fruton. J., 2002. A History of Pepsin and Related Enzymes, Q Rev Biol Vol. 77-127p.

Fredot E.,2005. Connaissance des aliments. Bases alimentaire et nutritionnelles de la diététique, Lavoisier, Paris, 424 p.

Fox P.-F.,1982.Exogenous enzymes in dairy technology, in Utilisation des enzymes en technologie alimentaire, Dupy P. Tech et Doc 1982 p135-157

Fox P.-F.,1989.The milk protein system in Developpements in dairy chemistry Functional milk proteins pp1-53 Elsevier science publishers

Green M.L, et Stackpoole A.,1975. The preparation and assessment of a suitable *Mucor* puccillus Lindt proteinase, swine Pepsin mixture for cheddar cheese – making. Journal of dairy research. P297-312.

Gonçalves, Gabriel Ramos Ferreira, Gandolfi, Olga Reinert Ramos, Brito, Mylena Junqueira Pinto, et al.,2021. Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. Process Biochemistry, vol. 111, p. 114-123

Guthy K.L. et Novak G.,1977.Observations on the primary phase of milk coagulation by rennet under standardized conditions, Journal of dairy research Vol 44 N°2 p363-366

Gupta, Kapish, Jana, Asim Kumar, Kumar, Sandeep, et al.,2015. Fermentation à l'état solide avec récupération de l'amyloglucosidase à partir de l'extrait par immobilisation directe dans un agrégat d'enzymes réticulées pour l'hydrolyse de l'amidon. Biocatalyse et biotechnologie agricole , vol. 4, n° 4, p. 486-492

Ghasemi, Mahsa.,2007 . Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma . Thèse de doctorat. Chimie ParisTech.

G.W. Sherer, J. Am. Ceram. Soc, 73 (1990) 3

.Hamd, Wael.,2009. Elaboration par voie sol-gel et étude microstructurale de gels et de couches minces de SnO₂. Thèse de doctorat. Limoges.

Hadj Abderrahmane H.,2014. Recherche des substances à activate antimicrobiennes produites par les souches bactériennes isolées à partir du lait bovin. Master académique microbiologie fondamentale et appliquée, université kasdimerbah, Ouargla, 55p.

Hamdan, Suzana.,2009. Studies of the preparations and use of sol-gel for enzyme immobilization and analytical applications. Thèse de doctorat. East Tennessee State University.

.Hong, Jiyeon, Jung, Dahun, Park, Saerom, et al.,2021. Immobilisation de la laccase via des agrégats d'enzymes réticulés préparés à l'aide de génipine comme agent de réticulation naturel. Journal international des macromolécules biologiques , vol. 169, p. 541-550.

Horn J.,1998.Education des adultes et développement, n° 50. 21-43p.

Horne D.S.,2002a.Caseins, micellar structure pp1902-1909 in Encyclopedia of Dairy Science. Roginski H., Fuquay J. Fox P. Elsevier

Hronska H, Grosová Z, Rosenberg M.,2009. Hydrolysis of lactose in milk by *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilized in polyvinylalcohol gel. Journal of Food and Nutrition Research. 48. 87-91.

Huppertz T, Upadhyay V, Kelly A, Tamime A.,2006. Constituents and properties of milk from different species. Brined cheeses. Edited by Dr Adnan Tamime. Copyright © 2006 by blackwell publishing Ltd. P1-34.

Jarrar, Haytem.,2011. Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles. Thèse de doctorat. Montpellier, Ecole nationale supérieure de chimie.

Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P., Brule G., 2008. Les produits laitiers. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, 185 p.

Jung, Sung-Kwon et Wilson, George S., 1996, Polymeric mercaptosilane-modified platinum electrodes for elimination of interferants in glucose biosensors. *Analytical chemistry*, vol. 68, no 4, p. 591-596

LI, Yanchun, Wang, Zhi, XU, Xudong, et al., 2015. A Ca-alginate particle co-immobilized with *Phanerochaete chrysosporium* cells and the combined cross-linked enzyme aggregates from *Trametes versicolor*. *Bioresource technology*, vol. 198, p. 464-469.

Lenoir J., Schneid N., 1987. L'aptitude du lait à la coagulation par la présure in *Le Fromage A*. Eck 2ème édition Tech. et Doc.

Lenoir J.N., Veisseyere R., 1987. Coagulation du lait par la présure et correction des laits de fromagerie in *La lait matière première de l'industrie laitière CEPIL*, INRA

Lecoq R., 1965. Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles, tome II, éditions DOIN-DERENET Cie, France, 1240 p.

Larbier m., et Leclercq B., (1992). Nutrition et alimentation des volailles. INRA, Paris, 347 p.

Lucey, J.A., 2002a. Rennet coagulation In : *Encyclopedia of dairy sciences*, Roginski H., Fox P.F. and Fuquay J.W., eds. Academic Press San Diego, CA pp : 286-29

Lucey, J. A., Johnson, M. E., and Horne, D. S., 2003. Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86, 2725–2743.

Lucey J.A., 2002b. ADSA Foundation Scholar Award, Formation and physical properties of milk proteingels. *J. Dairy Sci.* 85, 281-294

MA, Hong-Zhi, YU, Xiao-Wei, Song, Cong, et al., 2016. Immobilisation de la lipase B de *Candida Antarctica* sur silice modifiée époxy par procédé sol-gel. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatique*, vol. 127, p. 76-81.

MacKinlay A.G. and Wake R.G., 1971. κ -Casein and its attack by rennin (chymosin) pp 175-212 in *Milk proteins chemistry and molecular biology*. Edited by H.A McKenzie. Volume II Academic press

Mathieu J., 1998. Initiation à la physicochimie du lait, Tec et Doc., Lavoisier, 220 p.

Mailhe M. et pressa M. (1860): De la pepsine et ses propriétés gastriques, Librairie de victor masson, 32p

M. Bathat., 1992. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard, Lyon 1.

Messing R. A., 1976. Adsorption and inorganic bridge formations. In: *Methods in Enzymology*, volume XLIV, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, New York. 40: 148–169

Miletić, Nemanja, Nastasović, Aleksandra, et Loos, Katja., 2012, Immobilisation de biocatalyseurs pour les polymérisations enzymatiques : possibilités, avantages, applications. *Technologie des bioressources*, vol. 115, p. 126-135.

Michael Eskin N.A., 1990. *Biochemistry of food* 2nd edition Academic press, Inc.

Référence bibliographique

Mohamad, NurRoyhaila, Marzuki, NurHaziqahChe, Buang, NorAziah, et al.,2015. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology&Biotechnological Equipment*, vol. 29, no 2, p. 205-220.

Nouani A., Hamrani L., Bellal M. M.,2011. Purification et caractérisation de protéase coagulant le lait extraite a partir du proventricule de poulet (gallusgallus). Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours.

Outaleb T., 2006. Aptitude à la coagulation du lait par la pepsine ovine. *Mém.Ing.Agr.*, Institut National Agronomique, El Harrach (Alger), 54p.

Paez de Leon L, Pinzon G, Otaiza Vasquez E. Acta CientVene Z.,(1995). Purification and assay of chicken pepsin; PubMed - indexed for MEDLINE. 46: 237-41

Pessela B.C.C, Fernández-Lafuente R, Fuentes M, Vián A, García J.L, Carrascosa A. V, Mateo C, Guisán J.M.,2003a.Reversible immobilization of a thermophilic β galactosidase via ionic adsorption on PEI-coatedSepabeads.*Enzyme and MicrobialTechnology*. 32: 369-374.

P. Evans, T. English, D. Hammond, M.E. Pemble, D.W. Sheel.,2007.Applied Catalysis A: General, 321 140

Roy, J. Jegan et Abraham, T. Emilia., 2006. Préparation et caractérisation de cristaux d'enzymes réticulées de laccase. *Tourillon de catalyse moléculaire B : Enzymatique*, vol. 38, n° 1, p. 31-36.

Ribadeau-Dumas B., 1991.Physicochimie et biochimie des protéines du lait. Données récentes. *Lait* 71,133-139

Schmidt D.G., 1977.Association of casein and casein micelles structure. in *Développements in DairyChemistry-1 Proteins*. P.F. Fox applied Science Publishers

Sharma, Shivam, Gupta, PrincyShubham, Arya, Shailendra Kumar, et al.,2022. Enzyme Immobilization: Implementation of nanoparticles and an insight into polystyrene as the contemporary immobilization matrix. *ProcessBiochemistry*.

Sheldon, Roger A. et Van Pelt ., 2013. Sander. Immobilisation d'enzymes en biocatalyse : pourquoi, quoi et comment. *Revue de la société chimique*, vol. 42, n° 15, p. 6223-6235.

Siboukeur, Oumelkheir, Mati, Abderahmane, et Hesses, Brahim., 2005. Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait cameline (*Camelusdromedarius*): utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. *Cahiers agricultures*, vol. 14, no 5, p. 473-478

Sirisha, Vippula L., Jain, Ankita, et Jain, Amita., 2016.Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Advances in food and nutrition research*, vol. 79, p. 179-211.

Spasojevic, Milica, Prodanovic, Olivera, Pantic, Nevena, et al., 2019, L'immobilisation enzymatique : transporteurs et méthodes d'immobilisation. *Journal of Engineering &ProcessingManagement* , vol. 11, n° 2, p. 89-105.

.Staffan. M. et al.,1977.From regulatory proteolytic enzymes and their inhibitors, Ed Pergamumpress, 1978 University du Michigan .28Juil.2008, 35-38 p.

Slamani R., 2003.Optimisation d'une méthode d'extraction de la pepsine ovine. Essai de purification et de caractérisation. Mém.Mag.Agr., Institut National Agronomique, El Harrach(Alger), 43p.

Technique, Dossier. Le Procédé Sol-Gel. Rescoll centre technologique, 2004.

Tizchang, Samira, Khiabani, MahmoodSowti, Mokarram, RezaRezaei, et al., 2021. Immobilization of β -galactosidase by halloysite-adsorption and entrapment in a cellulose nanocrystals matrix. *BiochimicaetBiophysicaActa (BBA)-General Subjects*, vol. 1865, no 6, p. 129896.

Trabelsi, Ouissem.,2011. Etude des matériaux hybrides organiques-inorganiques élaborés par le procédé sol-gel. Thèse de doctorat. Reims.

Vignola C.L.,2002. Science et technologie du lait, transformation du lait. Presses internationales polytechnique, Québec; 608p

W. Hartmeier, 1988. *ImmobilizedBiocatalysts*, Éditions Springer-Verlag, Berlin,, p. 15-43.

W. Jin, J.D. Brennan 2002, *AnalyticaChimicaActa*, 1-36.

Xue, Lin, Long, Jie, LU, Cheng, et al., 2021. Immobilization of polygalacturonase for the preparation of pectic oligosaccharides frommango peelwastes and assessment of theirantibacterialactivities. *Food Bioscience*, vol. 39, p. 100837.

Yao, Lim Wen, Khan, FahadSaleem Ahmed, Mubarak, NabisabMujawar, et al.,2022. Aperçu de l'efficacité d'immobilisation de l'enzyme Lipase en tant que biocatalyseur sur l'oxyde de graphène pour l'adsorption des colorants azoïques des effluents d'eaux usées industrielles. *Journal des liquidesmoléculaires* , vol. 354, p. 118849.

Yamamoto A. (1975). *Proteolytic enzymes in Enzymes in food processing* 2nd Edition, Reed G. Academic press.

Zahirinejad, Sahar, Hemmati, Roohullah, Homaei, Ahmad, et al.,2021. Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 204, p. 111774.

Résumé :

Notre étude s'est portée sur l'extraction, la caractérisation et l'immobilisation de la pepsine de poulet en employant le procédé sol-gels.

Pour atteindre notre objectif on a entamé l'extraction de la pepsine à partir des proventricules de poulet, ensuite sa caractérisation par l'étude de son activité coagulante, sa force coagulante, et ces conditions optimales de température et de Ph. Puis on a procédé à l'étude de l'activité enzymatique de l'extrait de pepsine actif et non actif après immobilisation.

Les résultats obtenus ont démontré une diminution de l'activité enzymatique de la pepsine active de 88%, mais aussi l'apparition d'une certaine activité du pepsinogène qui est de 0,24 UP qui est dû à l'influence du HCl provenant du protocole sol-gel sur le pepsinogène non actif.

Mots clés : La pepsine de poulet, coagulante, immobilisation, sol-gel.

Abstract:

Our study focused on the extraction, characterization and immobilization of chicken pepsin using the sol-gel process.

To achieve our objective, we began the extraction of pepsin from chicken proventriculi, then its characterization by studying its coagulant activity, its coagulant strength, and these optimal temperature and pH conditions. Then we proceeded to study the enzymatic activity of active and non-active pepsin extract after immobilization.

The results obtained demonstrated a decrease in the enzymatic activity of active pepsin by 88%, but also the appearance of some pepsinogen activity which is 0.24 UP which is the influence of HCl from the protocol sol-gel on non-active pepsinogen.

Keywords : Chicken pepsin, coagulant, immobilization, sol-gel.