

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Pharmaco-Toxicologie



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Extraction, caractérisation et immobilisation
De la pepsine ovine**

Réalisé par :

BOUCHTOUT Rahma & BOUAOUN Samia

Dépôt: 11 septembre 2022

Devant le jury composé de :

Mme. AIT BRAHAM S.	MAB	Encadreur
Mr. AKSAS A.	MCA	Co-Encadreur
Mr. BOUDJOUAN F.	MCB	Président
Mr .AMIROUCHE A.	MCB	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Nous devons remercier ALLAH le tout puissant pour toute la volonté et le courage qui nous a données pour aboutir ce travail.

Nous tenons à remercier particulièrement notre encadreur madame Ait Braham sabrina et notre Co encadreur monsieur Aksas Ali pour avoir bien voulu accepter l'encadrement de ce travail de recherche et pour leurs conseils précieux et leurs patiences durant la réalisation de ce projet.

Non remerciements les plus vifs s'adressent aussi aux membres de jury honorables d'avoir accepté d'examiner et dévaluer ce travail.

Nous tenons par ailleurs à exprimer notre considération et nos sincères remerciements à Monsieur SIAR El-Hocine pour son aide précieuse et ses conseils avisés.

Il nous est agréable d'adresser nos remerciement monsieur Benramdane Elias, les ingénieurs du laboratoire pour leurs aides, leurs optimistes, leur encouragement.

Enfin, nous tenons de remercier à chaque un de nos familles, tous nos amis (es) qui n'ont pas hésités à nous donner leurs aides et du courage dans les moments difficiles et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie le fruit de ce
modeste travail:*

A mon Papa

Ce n'est qu'un fruit de ton sacrifice, soutient et encouragement.

A ma lumière MAMA

*aucun dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour toi, tu
as été toujours mon exemple dans la vie, tu as fait de moi ce que je suis Aujourd'hui
tes sacrifices et ta fatigue ont fleuri et ne sont pas partis en vain.*

A mon frère Moumen

*Tu es mon deuxième papa, Tu m'as apporté ton soutient avec ton innocence, tu as
toujours été à mes côtés quand j'avais besoin de toi.*

A ma sœur jumelle Meriem

*Tu m'as accompagné dans chaque pas, tu as partagé avec moi mes rires et mes larmes,
mes joies et mes peines.*

A mon petit frère Abdou

Je te souhaite un avenir plein de réussite et je te promets d'être toujours là pour toi

A mon binôme Samia

*Pour les moments qu'on a vécu ensemble les obstacles qu'on a pu surmonter .je te
remercie d'avoir été là pour moi, on a réussi !*

A mes chères amies

*Qui j'ai aimé et estimé du fond du cœur. : Houda, Nacera, yasmine ,Ryma, karina
,djoudjou, Je vous souhaite une brillante réussite dans la vie professionnelle,
familiale une bonne santé et une vie inondée de bonheur.*

Merci mon dieu pour ta bénédiction

Rahma

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie le fruit de ce modeste travail:

A ma mère «RABHA»

Qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. Je leur dit merci mille fois, qu'ALLAH me les garder

« Je t'aime Mamiti »

A mon père « AHMED »

Qui peut être fier de trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi ... tu es le meilleur père du monde

« Je t'aime papitou »

A mes frères MASSIN et KHALED et ma sœur SIHAM

*Qui n'ont cessé de m'encourager et à qui je souhaite réussite et bonheur dans leurs vies
Votre fierté de moi me vaut tous les diplômes du monde.*

Je vous aime

A mon cousin BELKACEM

Pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire

A mon binôme «RAHMA»

Ma meilleur amie ma confidente ma sœur de cœur pour sa patience, son soutien, son courage. Nous avons traversé un parcours ensemble dont on a eu des bons et des mauvais moments .je te souhaite plein de succès de joie et de bonheur que dieu te garde et illumine ton chemin.

A mes chères amies

Qui j'ai aimé et estimé du fond du cœur. : YASMIN

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Je vous souhaite une brillante réussite dans la vie professionnelle, familiale une bonne santé et une vie inondée de bonheur

Merci à tous et à toutes

Samia

Liste des abréviations

AC : activité coagulante

BSA : Albumine sérum bovin

g : gramme

HCl : acide chlorhydrique

M : Molarité

Min : minute

ml : millilitres

NaCl : chlorure de sodium

NaHCO₃ : bicarbonate de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

Nm : nanomètre

pH : Potentiel hydrogène

RGO : le reflux gastro œsophagien

TCA : acide trichloracétique

TEOS :Tétraethyl orthoilate

U.A.C :L'unité d'activité coagulante

UIB : L'Union internationale de biochimie

µL: microlitre

UP : unité de présure

v : volume de l'extrait enzymatique

V : volume de lait

Tableau 01. Composition en acides aminés de la pepsine porcine basée sur la séquence d'acides aminés (Tang et al. 1973)	8
Tableau 02: Composition moyenne du lait de vache (g/l) (MATHIEU, 1998).....	13
Tableau 03 : Principales caractéristiques de l'enzyme extraite.	22
Tableau 04: Résultats obtenus lors de l'immobilisation.....	26

Figure 01 :Structure tridimensionnelle de deux enzymes très largement utilisées dans les industries alimentaires (a) l'alpha amylase de <i>Bacillus licheniformis</i> (b) la chymosine de veau (<i>Bos taurus</i>) (GROVES <i>et al.</i> ,1998).....	3
Figure 02 : Schéma représentant la catalyse enzymatique (Wiley-VCH, 2000).....	6
Figure 03 : Technique d'immobilisation (Ozturk, 2001).....	11
Figure 04 : Image d'une caillette ovine	14
Figure 05 : Principales étapes d'extraction de la pepsine ovine (BOHAK, 1970).....	15
Figure 06 : Extrait enzymatique brute	16
Figure 07 : Courbe d'étalon obtenue avec BSA.....	18
Figure 08 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de la pepsine ovine	24
Figure 09 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la pepsine ovine	25
Figure 10 : Représente la silice obtenue par l'immobilisation de la pepsine active.....	27
Figure 11 : Représente la silice obtenue par l'immobilisation de la pepsine non active	27

Introduction	1
CHAPITRE I : Etude bibliographique	
I.1.Généralités sur les enzymes	3
I. 1.1.Définition d'une enzyme	3
I. 1 .2.Structure des enzymes.....	4
I. 1.3.Nomenclature et classification des enzymes	4
I. 1 .4.Catalyse des enzymes	5
I. 1 .5.Domaines d'application des enzymes	6
I.2.Généralités sur la pepsine	7
I.2 .1.Définition	7
I.2.2.Origine	7
I.2.3.Strucutre générale	7
I.2.4.Activité catalytique.....	9
I.2.5.Domaine d'utilisations	9
I.3.Immobilisation de la pepsine.....	9
I.3.1.Définition	11
I.3.2.Technique d'immobilisation	11
CHAPITRE II : Matériel et Methodes	
II.1.Matières premières	13
II .1.1. lait	13
II.1.2 Pepsine	14
II.1. 2.1. Extraction de la pepsine Ovine	14
II.1. 2.2. Caractérisation de l'extrait enzymatique	16
II.1. 2.2.1. Teneur en protéines	16
II.1.2. 2.2. Activité protéolytique	17
II.1.2. 2.3. L'activité coagulante :.....	18
II.1.2. 2.4. Force coagulante.....	19
II.1.2. 2.5. Activité spécifique	19
II.1. 2. 3. Détermination des conditions optimales d'activité de l'extrait enzymatique	19
II. 2.Immobilisation de l'enzyme	20
II. 2.1. Produits chimiques	20
II. 2.2. Elaboration de l'échantillon.....	20
II. 2.2.1. Préparation du gel silice.....	20

II.2.3. Immobilisation de l'enzyme non active	21
-----------------------------------------------------	----

CHAPITRE III : Résultats et discussion

III.1 .Caractéristiques des extraits enzymatiques	22
III .1.1 .Rendement de l'extraction	22
III.1.2. Détermination de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique:	22
III .1.3 .Dosage des protéines totales	23
III.2 .Conditions optimales de coagulation.....	23
III.2.1 .Influence du pH du lait sur l'activité coagulante	23
III.2.2 .Influence de la température du lait sur l'activité coagulante	25
III.3. Immobilisation de la pepsine.....	26
Conclusion	29

Références bibliographiques

INTRODUCTION

La vie repose sur une série de réactions chimiques soigneusement orchestrées basées sur des catalyseurs que nous appelons maintenant des enzymes qui accélèrent considérablement ces réactions chimiques. La capacité catalytique des enzymes facilite les processus vitaux dans presque toutes les formes de vie, des virus aux humains (**Copeland, 2004**).

En fait, certains organismes, à l'aide d'enzymes, peuvent dégrader des composés dans l'environnement, cette propriété peut être utilisée dans certaines industries dans différents domaines, et a également une utilisation très importante dans l'industrie alimentaire.

Nous rencontrons des enzymes dans tous les aspects de la biologie et nous devons admirer leur travail délicat. Les enzymes protéolytiques sont d'excellents modèles et des exemples précoces de compréhension de la structure et de la fonction des protéines, ceux-ci comprennent des enzymes telles que le lysozyme du blanc d'œuf, la ribonucléase A (RNase A) du pancréas bovin et la chymotrypsine, la pepsine... Certaines de ces enzymes ont été rencontrées lors de l'étude du processus digestif. La sélectivité des protéases a été développée et elles ont été utilisées comme réactifs utiles pour le clivage et l'étude de la structure des protéines. (**Kornberg, 1987**).

Alors que l'utilisation de ces derniers est limitée par leurs propriétés biologiques, leur disponibilité, leur prix élevé et les paramètres environnementaux ou le processus par lequel ils sont utilisés (**Han et al., 2015**).

La pepsine est utilisée comme agent biochimique et trouve diverses applications dans différents domaines (médecine, alimentation, environnement, etc.), sa demande augmente de jour en jour, mais son processus de fabrication coûteux, son utilisation limitée par son instabilité due à la dénaturation, la désactivation et l'autolyse font que ce biocatalyseur est relativement peu utilisé, pour pallier à ces lacunes, plusieurs méthodes d'immobilisation ont été développées (**Zhai et Sun, 2014**).

La pepsine a été immobilisée dans différentes matrices par diverses méthodes, telles que le polyéthylène (**Meridor et Gedanken, 2014**), la silice-chitosane (**Cahyamingrem et Sianita, 2014**), les poly méthacrylates (Han et al., 2015) et le gel de silice activé (**Szlapata et al., 2016**).

Dans cette étude, nous avons immobilisé la pepsine dans une matrice de silice synthétisée par une méthode sol-gel.

La technique d'immobilisation sol-gel est largement utilisée pour fabriquer des immobilisats bioactifs qui implique le piégeage de protéines fonctionnellement actives dans des matrices obtenues à partir d'alkoxydes métalliques par polymérisation, hydrolyse et condensation qui forme une structure de gel poreux.

Ces dernières années, l'encapsulation dans des biomatériaux a fait l'objet de nombreux excellents articles de synthèse (**Péter *et al.*, 2005**) car c'est une méthode de mise en œuvre simple, peu coûteuse et qui permet de travailler à des températures bien plus basses qui favorise l'activité enzymatique (**Livage, 2000**).

Il est connu depuis longtemps que l'homme a utilisé plusieurs méthodes pour faire cailler le lait de ses chèvres, brebis et ses vaches dans le but de le conserver, dont l'enzyme coagulante était juste d'origine végétale ou animal.

Dans notre travail nous avons souligné une problématique autour de l'extraction et la caractérisation d'une protéase coagulante du lait dénommée la pepsine ovine, issue des caillettes d'ovins adultes, en suite on a étudié la possibilité de son immobilisation dans une matrice de silice élaborer par la voie sol-gel.

CHAPITRE I

I.1. Généralité sur les enzymes

I.1.1. Définition d'une enzyme :

Les enzymes sont des macromolécules de nature protéique et des catalyseurs biologiques des organismes vivants (Donald et Judith, 1998). Une partie importante des enzymes est le site actif, C'est au niveau de ce site qui est généralement sous la forme d'une cavité que se fixe le substrat qui pourra alors être soumis à l'action de l'enzyme afin de le transformer en produit (Pelmont, 1995).

Les enzymes sont responsables de la dégradation de molécules complexes en molécules plus facilement assimilables (Meunier, 1999). Ils sont à la fois spécifiques au type de réaction catalytique et à un seul substrat ou un petit ensemble de substrats fortement liés (Granner, 2008).

L'une des propriétés les plus pertinentes et les plus intéressantes des enzymes est leur spécificité. Certaines enzymes sont absolument spécifiques, cela signifie que ces enzymes ne catalysent qu'une seule réponse spéciale. D'autres enzymes par contre peuvent catalyser plusieurs liaisons chimiques différentes (Jaeger et Eggert, 2004).

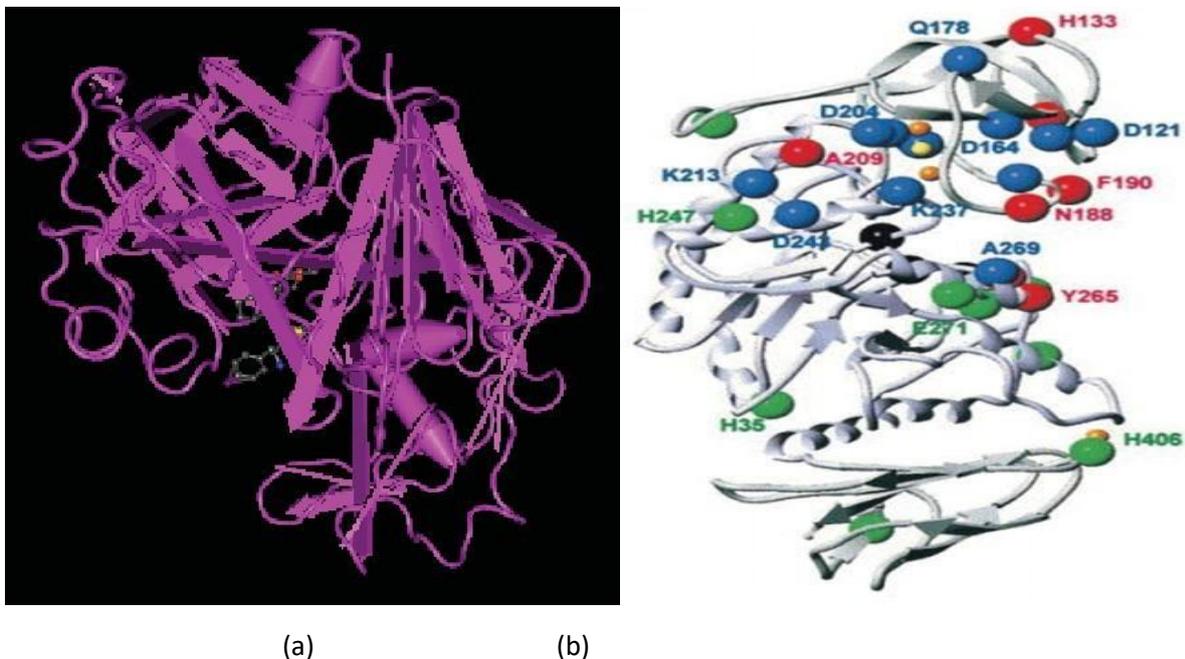


Figure 01 –(Structure tridimensionnelle de deux enzymes très largement utilisées dans les industries alimentaires (a) l'alpha amylase de *Bacillus licheniformis* (b) la chymosine de veau (*Bos taurus*) (Groves *et al.*, 1998).

I.1. 2. Structure des enzymes :

Les chaînes polyamides des enzymes sont disposées dans une structure tridimensionnelle. Des groupes hydrophiles polaires tels que $-CO_2H$ (acide aspartique et acide glutamique), $-OH$ (sérine, thréonine), NH_2 (lysine, arginine), $-SH$ (cystéine) et $CONH_2$ (glutamine et asparagine) sont situés sur la surface externe de l'enzyme, d'autre part, des substituants hydrophobes tels que les chaînes alkyle (valine, leucine et isoleucine) et les chaînes aryle (phénylalanine) acide, tyrosine et tryptophane) sont situés à l'intérieur de la protéine. La surface de l'enzyme est recouverte d'un film d'eau, cette eau constitue 5 à 10 % du poids sec total des enzymes lyophilisées dites « eau structurée » (**R. Cooke et al .,1974**), elle est nécessaire au maintien de l'activité enzymatique.

La structure de l'enzyme est stabilisée par la liaison hydrogène et les interactions de van der Waals(**C. Tanford ,1961**) et (**G. E. Schulz et al. ,1979**).

I.1.3. Nomenclature et classification des enzymes :

Les enzymes sont souvent nommées d'après les réactions qu'elles effectuent, généralement, le suffixe "ase" est ajoutée au nom du substrat ou type de réaction, les exceptions à cette règle sont certaines enzymes initialement étudiées telles que la pepsine, la chymosine et la trypsine, l'Union internationale de biochimie (UIB), a suggéré que le nom de l'enzyme indique les substrats appliqués et le type de réactions catalysées (**Fabiano, 2002**).

La classification la plus utilisée est la classification EC qui signifie « Enzyme Comité», son but est de combiner différentes réactions qui peuvent catalysées une enzyme, le système de nomenclature de cette classification est numérique, chaque numéro CE (sous la forme A.B.C.D) est associé au nom proposé de l'enzyme correspondant, les nombres A, B, C et D représentent chacun une caractéristique de l'enzyme qui permet sa reconnaissance, le premier chiffre indique le type de réaction catalysée, le second est le substrat général impliqué dans le processus de réaction, et le troisième est le substrat en référence, le quatrième est le numéro de séquence de l'enzyme(**Garret, 2014**).

On dénombre différents types de la réaction catalytique:(**Jarrar, 2011**)

- **EC 1 oxydoréductase** : catalyse les réactions redox.
- **EC 2 transférases**: transfère un groupe fonctionnel (par exemple un groupe méthyle ou phosphate).
- **EC 3 hydrolases** : catalyse l'hydrolyse de diverses liaisons.

- **EC 4 Lyases** : Rompt diverses liaisons par des procédés autres que l'hydrolyse et oxydation.
- **EC 5 isomérases** : catalyser les réactions d'isomérisation de manière simple (moléculaire).
- **EC 6 Ligases** : Deux molécules sont liées par des liaisons covalentes.

I.1.4. Catalyse des enzymes :

Les enzymes agissent sur des molécules spécifiques appelés substrats, pour produire des produits de réaction donnés, ceux-ci impliquent des propriétés chimiques spécifiques du substrat donnent aux enzymes la capacité d'effectuer les transformations (**Bender *et al.*, 1984**).

Les enzymes donc sont des molécules chimiquement réactives qui agissent sur le substrat, par le biais d'acides aminés naturels qui composent leurs sites actifs, la disposition de ces acides aminés détermine la topologie de la stéréochimie, l'hydrophobicité et les propriétés électrostatiques du site actif, ces propriétés définissent quelles molécules peuvent se lier au site actif et catalyser l'activité en question (**Bataille, 2018**).

Lorsqu'une protéine et un ligand (substrat) se lient pour former un complexe binaire, le complexe devrait aboutir à un système qui est significativement stable, la stabilisation des interactions protéine-ligand est formée de : liaison hydrogène, forces hydrophobes, interactions de van der Waals, interactions électrostatiques, etc. (**Wiley-VCH, 2000**).

La formation du complexe binaire enzyme-substrat n'est que la première étape du processus de transformation appelé Complexe ES ou Michaelis, qui sera suivi de plusieurs réactions chimiques. A la fin de la catalyse, le produit (EP) est finalement dissocié pour libérer la molécule de produit pour reformer l'enzyme libre prête pour une nouvelle catalyse (**Wiley-VCH, 2000**).

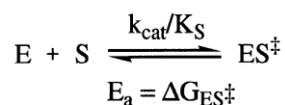
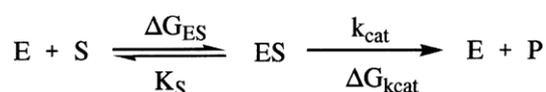


Figure 02: Schéma représentant la catalyse enzymatique (**Wiley-VCH, 2000**).

4-1 Facteurs influencent sur l'activité enzymatique :

Les facteurs qui influencent l'activité enzymatique sont liés à l'environnement réactionnel tel l'action des agents physiques comme pH, température, force ionique ...

a-pH : L'effet de pH est dû à trois actions indépendantes :

- un effet de dégradation irréversible dénaturation de l'enzyme aux PH extrêmes, causé par des modifications de la structure spatiale de l'enzyme.
- Un effet sur l'état d'ionisation du substrat.
- Un effet sur l'état d'ionisation de l'enzyme : la variation d'activité en fonction du PH est liée à la variation de l'état d'ionisation d'un nombre restreint de groupe dissociable de la protéine enzymatique (**Penasse, 1991**).

b-Température :

Il est toutefois important de préciser l'importance de l'effet de la température sur l'activité enzymatique car cette dernière peut provoquer sa dénaturation. Pour cela l'activité de l'enzyme augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à un certain seuil et la température de dénaturation peut varier, mais seules quelques exceptions s'éloignent vraiment de la gamme 40 - 60 °C (température de la dénaturation) (**Robert et Whitehurs, 2010**).

I.1.5. Domaines d'application des enzymes :

Les enzymes sont des macromolécules de nature protéique qui peuvent être utilisées dans plusieurs procédés industriels que ce soit dans la chimie fine, l'industrie pharmaceutique, ou l'industrie alimentaire ... (**Danson et Hough, 1998**) et (**Schiraldi et Rosa, 2002**).

sont utilisés dans la transformation de produit tel que les produit laitiers, les boissons, les produits de boulangerie et plusieurs d'autres produits, comme on peut aussi les utiliser au tant que additifs alimentaires dans le but d'améliorer les propriétés organoleptiques des aliments tels que la libération des arômes (**MKademiet al., 2001**).

Certains enzymes ont un rôle important dans le secteur de la santé comme ceux utilisé pour améliorer la digestion de certains aliments.

Grace aux développements technologiques, il est désormais possible de développer directement des enzymes qui s'adaptent aux besoins industriels telles que : les cosmétiques, le papier, le cuir et les détergents... (**M Kademi*et al.*, 2001**).

I.2. Généralité sur la pepsine

I.2.1. Définition :

La pepsine (EC 3.4.23.1) est une protéase aspartique (F.S. Mohseni-Shahri *et al.*, 2018), une enzyme digestive essentielle responsable de la plupart des activités digestives dans l'estomac (Goleet *al.*, 2000), dont le rôle principal consiste à convertir les protéines alimentaires en peptides digestibles plus petites (J.S. Fruton *et al.*, 2002). Elle a été la première enzyme animale découverte par Theodor Schwann en 1836 (O.C. Aszmann *et al.*, 2000).

Le pH optimal de la pepsine se situe entre 1,8 et 4,4, et elle est inactivée par le bicarbonate alcalin du suc pancréatique (Raisonnier, 2004). Il est thermosensible en solution à 55°C et totalement dénaturé au-dessus de 70°C (Gour Soud, 1999).

I.2.2. Origine :

La pepsine est l'une des trois principales enzymes protéolytiques du système digestif, la concentration dans le suc gastrique est de 400 mg/L. La pepsine est produite sous une forme inactive (pepsinogène) dans la paroi de l'estomac converti en sa forme active (pepsine) par HCl de l'estomac (G.D. Altun *et al.*, 2007). Le pepsinogène est une molécule à deux lobes (terminaux N et C) qui est stable à pH alcalin. Cependant, lorsque le pH descend en dessous de 5, le N-terminal a été éliminé, libérant de la pepsine active avec des poids moléculaires compris entre 34 et 37 kDa (Morellon-Sterling *et al.*, 2022) et (A. Bougatif *et al.*, 2008).

Il a été rapporté que le comportement de cette enzyme dans les milieux acides est soutenu par un groupe phosphate lié de manière covalente à Ser68. Il en résulte que la pepsine a une charge nette négative même à pH acide (A.R. Sielecki *et al.*, 1995), c'est pourquoi cette enzyme est très efficace dans les environnements acides (pH 1-3). (BRENDA, 2022) et (Q.Luo, D *et al.*, 2018).

I.2.3. Structure générale :

La pepsine est une protéine poly tryptophane contenant cinq résidus tryptophane (Trp39, Trp141, Trp181, Trp190 et Trp300). Elle se compose de deux domaines d'homologie structurale : le domaine N-terminal (résidu 1e172) et le domaine C-terminal (résidu 173e326). Dans l'espace entre les domaines, il existe un site de liaison actif à la pepsine auquel de nombreuses petites molécules peuvent se lier. Il est caractérisé par deux résidus

catalytiques d'aspartate (Asp32 et Asp326). (Asp32 et Asp215), dont l'une doit être protonée et l'autre déprotonée pour que la protéine soit active (Antonov *et al.*, 1978).

La molécule de cette enzyme contient 327 résidus dans une chaîne polypeptidique (**tableau 1**), 37 résidus à l'extrémité carboxyle (résidus 291-327) et trois liaisons disulfure entre les résidus 45 et 50. Appariés ; 206 ; et 210 ; 250 et 283. Le seul résidu phosphoséryle est en exposition 68 et le résidu histidyle en position 53. Il a été démontré que les deux résidus arginyle près de l'extrémité carboxyle et le seul résidu lysyle sont respectivement situés aux numéros 308, 316 et 320 (Tang *et al.*, 1973).

Contrairement aux positions des résidus basiques, il y a un total de 44 résidus acides (y compris la phosphosérine) présents dans toute la chaîne polypeptidique.

Plusieurs résidus de la molécule de pepsine impliqués dans l'activité catalytique de cette enzyme peuvent maintenant être identifiés dans sa structure linéaire. Le résidu aspartyle pour la réaction avec l'époxyde de type substrat 1,2-époxy(p-nitrophénoxy)propane est situé au résidu 32. Il a été suggéré que ce résidu est directement impliqué dans la catalyse de digestion d'un carboxylate (Hartsuck, J *et al.*, 1972).

Un autre résidu aspartyle de site actif qui réagit avec l'inactivateur diazoïque se trouve au résidu 215. Le résidu arginyle 316 est le site de la modification 2,3-butanedione. Ce résidu semble être situé près du centre actif, bien qu'il ne soit pas directement impliqué dans la catalyse. Le résidu 4, estérifié avec du bromure de p-bromobenzoyle et considéré comme un résidu aspartyle, ne peut pas être localisé dans la séquence de la pepsine (Huang *et al.*, 2021).

Tableau 01. Composition en acides aminés de la pepsine porcine basée sur la séquence d'acides aminés (Tang *et al.* 1973)

Amino acid	Residues per molecule
Lysine	1
Histidine	1
Arginine	2
Aspartic Acid	30
Asparagine	12
Threonine	27
Serine	43

Phosphoserine	1
Glutamic Acid	13
Glutamine	13
Proline	15
Glycine	35
Alanine	16
Half –cystine	6
Valine	22
Methionine	4
Isoleucine	25
Leucine	27
Tyrosine	15
Phenylalanine	14
Tryptophan	5
Total	327
Molecular weight	34,644

I.2.4. Activité catalytique :

La pepsine clive les liaisons entre deux acides aminés dans des chaînes protéiques (appelées liaisons peptidiques) (**Kesckemétiet al.,2005**), où les acides aminés aromatiques (Tyr, Trp, Phe) exercent leurs fonctions amines (**Raisonnier, 2004**). Lors du clivage de la liaison peptidique, les deux acides aspartiques agissent à la fois comme donneurs et accepteurs de protons(**Dunn, 2002**).L'activité de cette enzyme dépend de l'ionisation de l'un de ces deux acides aspartiques, une liaison présente dans de nombreuses protéines alimentaires différentes, démontrant le rôle étendu de la pepsine dans l'industrie alimentaire (**Kesckeméti et al.,2005**). Lorsque l'équilibre des facteurs agressifs et protecteurs dans la muqueuse est perturbé, la pepsine peut endommager la muqueuse, entraînant des maladies telles que des ulcères (**jiet al.,2018**).

I.2.5. Domaine d'utilisations :

La pepsine est l'une des enzymes industrielles les plus importantes, elle représente environ 60% des enzymes présentes sur le marché(**O.dheyauldeensalahldinet al., 2021**). Cette enzyme a des applications dans diverses industries, notamment le tannage du cuir, les détergents, l'agrochimie, l'alimentation et les industries médicales (**A. Bougategfet al.,2008**).

En outre, la pepsine est également largement utilisée dans la production de haute capacité antioxydante(Y.-M. Wang *et al.*,2022) antihypertenseur(W.N. Baba *et al.*,2021), antibactérien(S. Choyametal.,2021) et de nombreuses autres activités biologiques et propriétés fonctionnelles (S.N. Mazloomiet *al.*,2021) et(C. Sosalagereet *al.*, 2022).

Dans l'industrie alimentaire il est largement utilisé dans la production de la bière, la clarification des jus et la fermentation des yaourts (W. Hartmeier *et al.*, 1979), la coagulation du lait pour la fabrication de fromage et d'autres aliments contenant des protéines du lait (Meridor *et Gedanken* ,2014) et (Diallo *et al.*,2018).

Dans le domaine de la médecine, la pepsine extraite de l'estomac des animaux est également utilisée pour traiter les patients atteints de maladies gastriques. Cependant, son isolement et sa production permettant son application dans différents procédés, tels que les applications médicales (ex. traitement de la dyspepsie)(K. Forssmann *et al.*,2017) et (K.-U. Petersen ,2018).

Les tests de qualité alimentaire (ex. simulation de digestion). De nombreuses études ont montré que la pepsine a de larges perspectives d'application dans la production d'hydrolysats de protéines et la libération de peptides (I.J. Vervaekeet *al.*,1989) et(C. Palma-Albinoet *al.*,2021) .

Une diminution de l'allergénicité de certaines protéines est fréquemment observée après traitement par la pepsine , donc la pepsine joue un rôle important dans la réduction du risque d'allergie due aux séquences de protéines sensibilisantes atteignant la lumière intestinale(J. Zhang *et al.*,2020) et (O. Azdadet *al.*,2018) .

A cet égard, il a été observé que le traitement à la pepsine réduit l'hypersensibilité à certaines protéines, qui est étroitement liée à l'une des fonctions de cette enzyme dans le système digestif humain (J. Zhang *et al.*,2020) et (O. Azdadet *al.*,2018).

Cette enzyme est un déterminant majeur du reflux gastro-œsophagien (RGO).Elle a été utilisée pour développer des tests diagnostiques simples et donnant des résultats rapides (Johnston *et al.*, 2018). Elle a également un rôle physiopathologique dans l'hypertension et la surexpression de la cathepsine D en tant qu'indicateur pronostique de l'agressivité de la tumeur mammaire chez les patientes avec un diagnostic ganglionnaire négatif (Da Silva Gomes *et al.* , 2002).

I.3. Immobilisation de la pepsine

I.3.1. Définition

L'immobilisation d'enzyme implique l'incorporation d'une enzyme sur un substrat ou support solide afin de savoir si l'enzyme conserve ses caractéristiques (son activité enzymatique et sa stabilité) après l'immobilisation.

Il est important que Le matériau utilisé comme matrice assure la circulation libre des molécules et produits matriciels entre la matrice et la matrice du milieu réactionnel, mais la matrice idéale devrait posséder les propriétés suivantes : stabilité, inertie de réaction et dureté physique, qui la rendent quelque peu résistante (Sirisha, 2016).

Pour cela nous avons immobilisé la pepsine dans une matrice de silice synthétisée par la méthode sol-gel.

I.3.2. Technique d'immobilisation :

De nombreuse méthodes d'immobilisations sont connues, dont les principales sont :(Ozturk, 2001)

- Immobilisation par liaison
- Inclusion
- Réticulation

Voir figure 03

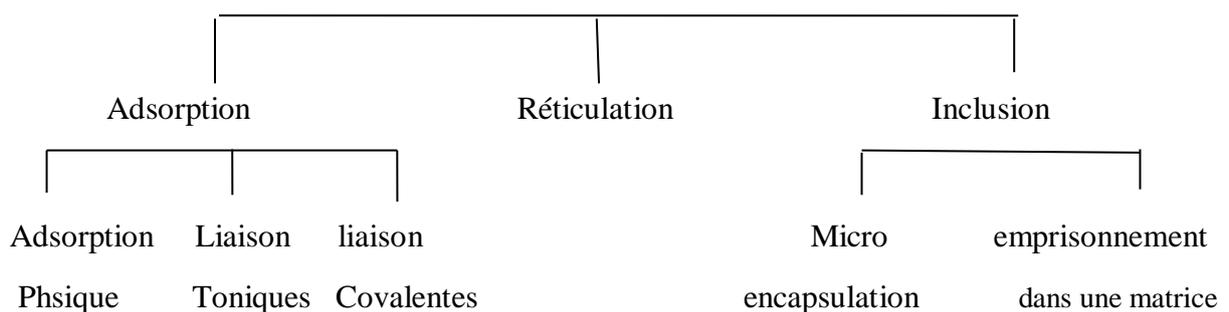


Figure 03 : Technique d'immobilisation (Ozturk, 2001).

Les Avantages et les inconvénients de sol-gel:

Parmi les avantages du procédé sol-gel (Aksas, 2011) :

- ✓ Le procédé sol-gel permet l'élaboration de matériaux à température ambiante et pression atmosphérique, ce qui offre des conditions idéales pour la manipulation de biomolécules
- ✓ Simplicité et répétabilité de production
- ✓ Mise en œuvre simplifiée, permettant la production directe de matériaux sous les formes les plus diverses
- ✓ Des matériaux sur mesure sont obtenus par des réactions de condensation contrôlées, permettant une polymérisation directionnelle et une optimisation des propriétés des matériaux en fonction de l'application envisagée
- ✓ Le matériau produit est d'une grande pureté et d'une bonne homogénéité
- ✓ La porosité du matériau obtenu permet le dopage et l'inclusion de plusieurs molécules.

Ces avantages font du sol-gel un procédé fréquemment utilisé cependant, il présente des inconvénients (Aksas, 2011) :

- ✓ Le cout élevé des précurseurs alcoxydes, leur disponibilité et leur toxicité
- ✓ La dépendance de ce procédé des paramètres environnementaux
- ✓ La maîtrise délicate du procédé et du temps de processus
- ✓ La manipulation d'une quantité importante de solvants

CHAPITRE II

II.1. Matières premières :

II.1.1. lait :

lait utilisé est du lait de vache récolté en mois juin de la région de Tazmalt (BEJAIA).

➤ **Définition :**

Le lait est une source importante de calcium et de protéines, riches en acides aminés essentiels, tout particulièrement en lysine qui est l'acide aminé de la croissance.

Ses lipides, caractérisés par une forte proportion d'acides gras à chaîne courte, sont beaucoup plus riches en acides gras saturés qu'en acides gras insaturés, Ils contiennent des quantités de cholestérol et de vitamine A ainsi que de faibles quantités de vitamine D et E (FAVIER, 1985).

Pour cela qu'il est reconnu comme un aliment bon pour la santé, il peut être ajouté à notre régime sous plusieurs formes (FRANWORTH et MAINVILLE ,2010).

La composition moyenne du lait de vache est représentée dans le tableau 02.

Tableau 02: Composition moyenne du lait de vache (g/l) (Mathieu, 1998).

Constituant du lait	Teneur (g/l)
Constituant minéraux	
Eau	902
Constituant salins minéraux	6,9
Gaz dissous	0,1
Constituant organique	
Constituant salins organiques	1,7
Lactose	49
Matière grasse	38
Protéines ou constituants azotés protéiques	
Caséine	32
Protéines dites solubles	26
constituants azotés non protéiques	6
Autres constituants	1,5

II.1.2 Pepsine :**II.1.2.1. Extraction de la pepsine Ovine :**

La matière biologique utilisée dans cette étude, pour extraire la pepsine ovine est constituée des caillottes d'ovins adultes, récupérées à l'état frais, au niveau de l'abattoir de Bejaïa. Ces dernières sont ensuite lavées à l'eau de robinet puis dégraissées, découpées, broyées à l'aide d'un mixeur, ils sont repartis en lots de 100g environ conditionnées dans des sachets en plastique, puis congelées à -18 °C .

La décongélation se fait d'une manière progressive pour éviter les chocs thermiques à des températures ambiantes.



Figure 04 : Image d'une caillotte ovine (Agrouche kahina et Sehaki Kania)

Procédé d'extraction : L'extraction de la pepsine a été réalisée selon le protocole d'extraction proposé par **BOHAK, (1970)** ; les principales étapes sont présentées dans la Figure 03.

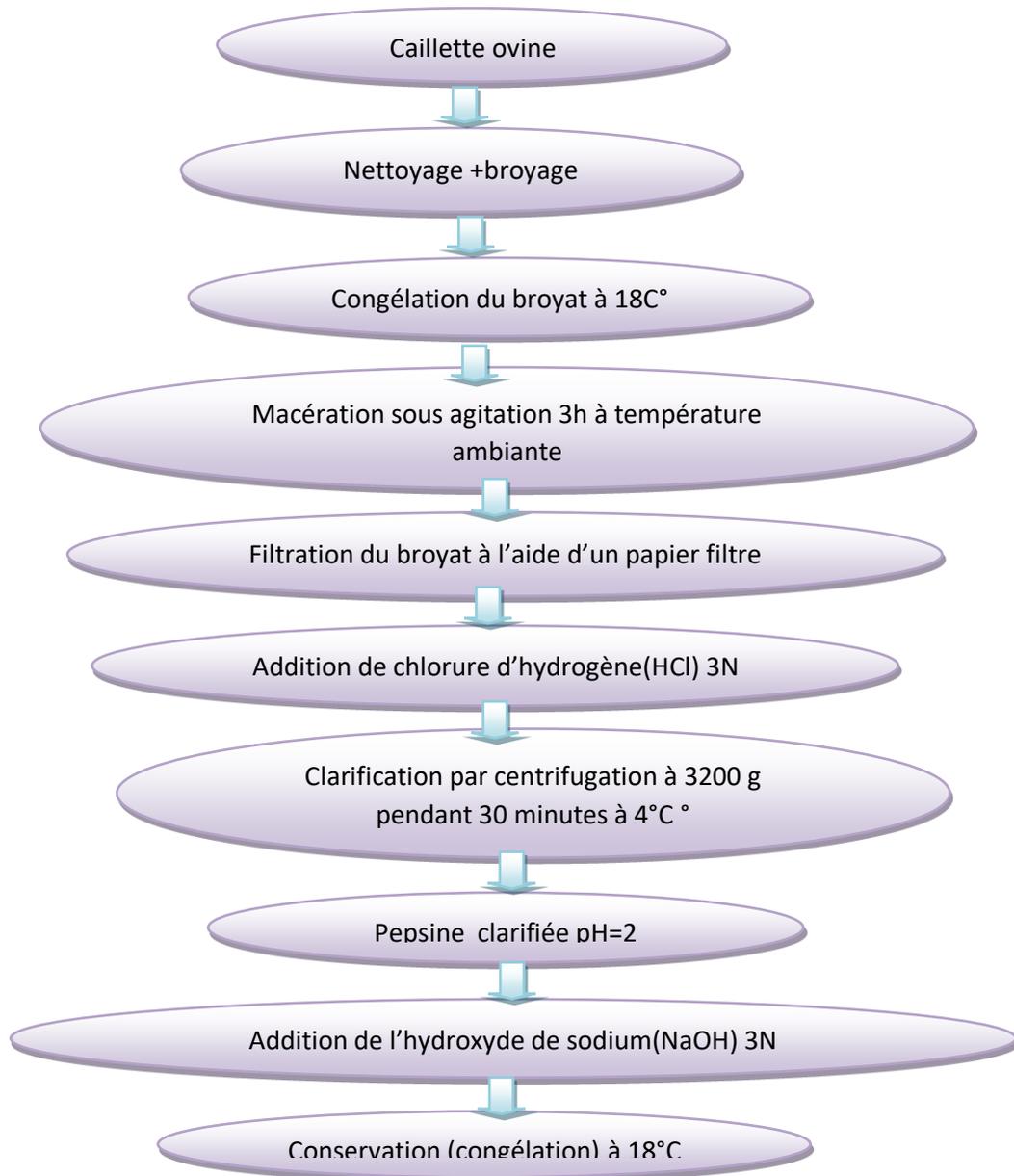


Figure 05: les principales étapes d'extraction de la pepsine ovine (**BOHAK, 1970**).

Les caillettes sont hachées au hachoir ménager. Verser la caillette hachée dans la solution saline de macération (30 g/l de NaCl et 7 g/l de NaHCO₃) à raison de 100 g de la solution de macération. La caillette hachée nécessite 300 ml de la solution de macération (**VALLES et FURET**), 1977 ; **BENYAHIA-KRID et al**, 2010 ; **NOUANI et al**, 2011). Après macération pendant 3 heures sous agitation .

le pepsinogène a été activé par acidification à pH = 2 à l'aide d'une solution HCl 3N. Le mélange a été maintenu à température ambiante pendant 15 minutes, Ce qui favorise

l'élimination ultérieure des mucus en provoquant leur floculation, ce qui favorisera la clarification. Ce mélange, représentant l'extrait brut de pepsine ovine, a été filtré à travers une gaze pour éliminer le retentât, et finalement le filtrat a été centrifugé à 3200 g pendant 30 minutes à 4°C dans une centrifugeuse. Le surnageant obtenu a été récupéré, représentant un extrait enzymatique clarifié, puis ajusté à pH 6,4 avec une solution de NaOH 3N et conservé à - 18°C (congelé) jusqu'à utilisation. Le culot qui représente le mucilage et les débris des tissus est éliminé.



Figure 06: Extrait enzymatique brute

II.1.2.2. Caractérisation de l'extrait enzymatique :

II.1.2.2.1. Teneur en protéines :

La teneur en protéines de l'extrait enzymatique brut est déterminée selon la méthode classique de Bradford .Cette méthode est basée sur la réaction au réactif de Folin-Ciocalteu ce dernier, à base de phosphomolybdates et de phosphotungstates, réagit avec les acides aminés tyrosines et tryptophane et à moindre degré avec la cystéine et l'histidine pour donner une coloration bleu caractéristique avec des maximum d'absorbance à 750 nm (NOBLE et BAILY, 2009).

• Réactifs et solutions :

- Solution (A): 1ml d'enzyme +9ml d'eau distillé.
- Solution (B): à partir de la solution A on prend 2ml +8ml d'eau distillé.
- Solution (C): on prend 1ml à partir de la solution B+9ml d'eau distillé.

• Protocole expérimental :

On pèse 0.05g de BSA et on ajoute 25ml d'eau distillée (solution à 2mg/ml) stock

A partir de stock (solution à 2mg/ml) on prépare une solution à 0.02mg qu'on appelle solution mère SM.

- Pour la solution mère on prend 0.3 ml de stock et on complète à 30ml
- A partir de SM, on prépare les autres dilutions :

0.02(SM)=0.3ml de stock+29.7ml d'eau distillé

0.015=7.5ml (SM) +2.5ml d'eau distillé

0.01 =5ml(SM) + 5ml d'eau distillé

0.005 =2.5ml(SM) +7.5ml d'eau distillé

0(bleu) =0ml SM +eau distillé

II.1.2.2.2. Activité protéolytique :

Deux millilitres de la solution de caséine à 1% dans le tampon acétate de Na de pH = 5,2 sont additionnés à 1ml de l'extrait enzymatique dilué. Le mélange réactionnel ainsi préparé est incubé pendant 10 min à 35°C. Après incubation, la réaction enzymatique est arrêtée par addition de 5 ml de solution trichloracétique (TCA) à 19%.Après un temps de repos de 15 minutes, les produits d'hydrolyse sont séparés par centrifugation à 6200g pendant 10 minutes. Le culot est éliminé et le surnageant est récupéré afin d'estimer la quantité des produits d'hydrolyse par la méthode de Lowry.

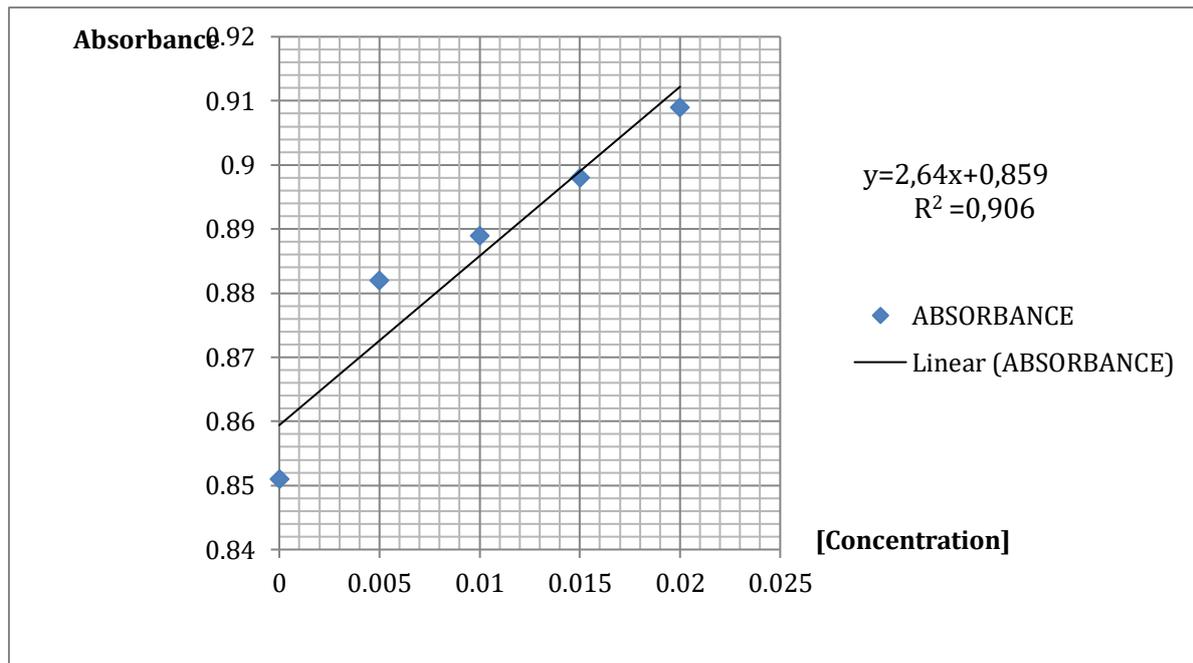


Figure 07 : Courbe d'étalon obtenue avec BSA

II.1.2.2.3. L'activité coagulante :

Exprimée par la rapidité avec laquelle l'enzyme coagule le lait, elle est déterminée par mesure du temps de floculation selon la méthode de **BERRIDGE (LIBOUGA *et al.*, 2006)** avec des modifications mineures. Le temps de floculation est l'intervalle de temps compris entre l'addition de l'extrait enzymatique et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu. L'unité d'activité coagulante (U.A.C.) ou l'unité présure est définie par la quantité d'enzyme contenue dans 1ml de la solution enzymatique qui peut coaguler 10 ml de lait (substrat standard de Berridge : 12% p/v de lait écrémé en poudre dissout dans une solution de CaCl_2 0.01M) en 100 sec à 30°C (ALAIS, 1974 ; RAMET, 1997).

L'activité coagulante est calculée par la formule suivante :

$$A.C = 10 \times V/T \times V'$$

Où : V : volume du lait ;

V' : volume de l'extrait enzymatique ;

T : temps de floculation.

▪ Protocole expérimental :

Le procédé consiste à ajouter 0,5ml d'extraits enzymatique à un volume de 5 ml de lait de vache dans un tube à essai porté à 35°C dans un bain Marie , puis noter le temps de floculation. Le tube immergé est maintenu incliné, de telle sorte que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du lait. Il est régulièrement animé d'un mouvement rotatif autour de son axe. Le lait forme ainsi un film mince et homogène. Au moment de la floculation, des petits flocons apparaissent au sein de ce film : c'est le temps de floculation.

II.1.2.2.4. Force coagulante

L'activité coagulante peut être également exprimée en force coagulante de Soxhlet (TSOULI, 1979 ; NOUANI *et al.*, 2009). Cette force coagulante définit le volume de lait coagulé par unité de volume de l'extrait enzymatique ou d'une enzyme, en 40 minutes, à 35°C et pH 6,4 du substrat (lait). La force coagulante est exprimée par la formule suivante :

$$F=2400 \times V/T \times v$$

Où :F : Force de l'enzyme (Soxhlet) ;

V : Volume du lait ajusté (pH : 6,4, T° :35°C) ;

v : Volume de la solution enzymatique ;

T: Temps de coagulation du lait (en secondes) ; Temps standard du test = 2400 secondes (40 min).

II.1.2.2.5. Activité spécifique

L'activité spécifique est exprimée par le rapport entre l'activité coagulante de l'extrait enzymatique et le taux de protéines de cet extrait. Ce rapport nous renseigne sur le niveau de pureté de la solution recherchée (NOUANI *et al.*,2009).

II.1.2.3. Détermination des conditions optimales d'activité de l'extrait enzymatique**➤ pH optimal :**

Le pH a une forte influence sur l'activité enzymatique et par conséquent sur le temps de floculation du lait (RAMET, 1997 ; HUPPERTZ *et al.*, 2006). Pour étudier l'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique, le pH du lait (substrat de Berridge) est ajusté aux valeurs suivantes: 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7,0 par addition d'une solution d'HCl ou de NaOH 1N.

Le choix de cet intervalle de pH est basé sur le fait qu'à des valeurs de pH inférieures à 5 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. L'activité coagulante est mesurée pour chaque valeur matériel et méthodes 32 de pH en U.A.C. /ml. La valeur de chaque activité coagulante correspond à la moyenne de trois essais.

➤ **Température optimale :**

L'influence de la température d'incubation du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique est déterminée dans un intervalle de température allant de 30 à 80 °C en fixant la température aux valeurs suivantes : 30 ; 35 ; 40 ; 45 ; 50 ; 55 ; 60 ; 65 ; 70, 75, 80. Le choix de ces températures est justifié par le fait que la coagulation du lait s'effectue à des températures supérieures à 30°C, mais à partir de 70°C l'extrait enzymatique risque d'être inactivé (RAMET, 1985). Pour les extraits d'origine végétale, cette température est insuffisante pour les inactiver (thermorésistantes) ce qui nous a poussé à utiliser des températures plus élevées pour déterminer l'optimum d'activité.

II.2. Immobilisation de l'enzyme :

II.2.1. Produits chimiques :

Agent de condensation : acide hydrochlorique (HCl) (SIGMA-ALDRICH) à 37%, d=1,2g/ml, incolore.

Solvant : éthanol absolu (C₂H₆) (SIGMA-ALDRICH) à 99,8%, incolore et d'odeur caractéristique.

Précurseur : Tétra-éthyle- ortho-silicate (TEOS)(SIGMA-ALDRICH) à 99% et d : 0,933%, incolore, d'odeur caractéristique et de formule chimique Si C₈H₂₀O₄

II.2.2. Elaboration de l'échantillon

II.2.2.1. Préparation de gel silice :

L'originalité de cette étude réside dans le procédé d'élaboration de la matrice ainsi que l'effet de la méthode d'immobilisation sur l'activité de notre enzyme, tous les verres utilisés comme supports d'immobilisation ont été synthétisés par sol-gel ayant le TEOS pour précurseur, et la pepsine a été immobilisée par méthode d'inclusion.

La préparation de gel de silice a été réalisée comme suit :

- Dans un bécher en verre, on ajoute 8ml de TEOS à 5.1ml d'éthanol absolue et on couvre le bécher de film alimentaire et on met sous agitation 10 min.
- On ouvre légèrement le film alimentaire et on ajoute 0.8 de l'extrait enzymatique, puis on renferme et on laisse agir pendant encore 10min.
- On ajoute 0.8 d'HCl et on verse le mélange rapidement dans une boîte pétri propre.
- On ferme la boîte et la met dans un endroit stable pour la gélification.

II.2.3. Immobilisation de l'enzyme non active :

L'immobilisation effectuée de Protocol précédent avec l'ajout de l'enzyme non active c'est à dire lors de l'extraction de cette enzyme, il n'a pas été activé par HCL.

Pour cela Nous avons pris le disque obtenue par Protocol précédent d'immobilisation et nous l'avons mis dans 5ml du lait. La température d'incubation est fixée à 35 °C.

CHAPITRE III

III.1. Caractéristiques des extraits enzymatiques:

L'extraction de la pepsine est effectuée par centrifugation (3200g pendant 30 min à 4°C).

III.1.1. Rendement de l'extraction :

Le diagramme de base appliqué pour l'extraction de la pepsine ovine consiste, essentiellement à une macération de fragments des caillettes dans une solution saline. L'extrait brut obtenu après filtration sur gaze du macéras est clarifié par centrifugation. Le pepsinogène contenu dans l'extrait brut est préalablement activé en pepsine. Le tableau 03 donne les caractéristiques des extraits bruts et clarifiés obtenus à partir de 100 g :

Tableau 03 : Principales caractéristiques de l'enzyme extraite.

Caractéristiques	Pepsine
Taux de protéine (mg/ml)	51 mg/ml
Activité coagulante (UAC) (UP)	1.8UP
force coagulante	452,831
Activité spécifique UP/mg	0,035 UP/mg
Couleur	Marron clair
Texture	Liquide

Le rendement d'extraction exprimé en unité d'activité coagulante par 100g de caillette est égal à 504, ce rendement correspond à l'activité enzymatique du volume total de l'extrait obtenu dans 300ml de solution d'extraction.

L'extrait clarifié de pepsine obtenu selon le protocole de **Bohak, (1970)** est une solution liquide de couleur marron clair, ce résultat est comparable à celui rapporté par **AZZOUZI Roumaïssa et YAGHLA Besma, (2020)**. Caractérisé par une teneur en protéine de 51 mg/ml.

III.1.2. Détermination de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique:

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique brut des caillettes ovines est de 1.8UAC. Cette valeur est forte, comparativement à celle trouvée par **Hamzioui et Bariz (2008)**, qui est de 0.0008, ainsi que celle obtenue par **Outaleb (2006)** et **Benaïcha et Sahi (2009)**, qui est de

0.0008, **Belhamich (2005)** au cours d'une étude réalisée sur l'extraction la purification et la caractérisation de la coagulase de *Mucor Pusillus* a obtenu une force de coagulation de 0.0008 Les travaux réalisés par **Salmani (2003)**, montrent que l'activité coagulante et le rendement d'extraction varient relativement, de manière proportionnelle avec la quantité des caillettes mise en œuvre. En effet, une augmentation du poids des caillettes entraîne une augmentation de l'activité coagulante, et une diminution du rendement d'extraction. Cependant, selon le même auteur, au-delà de 80 g de caillette mise en œuvre, la variation de l'activité coagulante et du rendement d'extraction est relativement faible.

III.1.3. Dosage des protéines totales :

Le dosage des protéines totales de l'extrait enzymatique est effectué par la méthode de **Bradford(1976)**. La concentration en protéines totale obtenu est de 51 mg/ml, cette valeur est supérieur à celle de **Benaicha et Sahi (2009)**, qui était de 2,16 mg /ml, ainsi que la valeur obtenue par **Lafri et Mihoubi (2008)** pour le poulet qui était de 6,9mg/ml et **Belhamiche (2005)** a obtenu un taux de 2,47 mg/ml de protéines pour l'extrait coagulant de *Mucor pusillus*.

Dans le but de déterminer les conditions physico-chimiques optimales pour l'action de l'extrait de la pepsine, nous avons essayé de voir l'influence de certains paramètres sur leur activité coagulante par comparaison aux résultats obtenus :

III.2. Conditions optimales de coagulation :

Plusieurs facteurs influent sur la coagulation tels que la concentration en enzymes, le pH du lait, la teneur en calcium, et la température (**Jeantet et al. 2008**).

Dans le but de déterminer les conditions physico-chimiques optimales pour l'action de pepsine (poulet, ovine), nous avons essayé de voir l'influence de certains paramètres sur leur activité coagulante par comparaison entre les deux (nous avons comparé avec les résultats de l'effet de Ph et température du lait sur l'activité coagulante obtenu par Monsieur **SIAR EL-Hocine**)

III.2.1. Influence du pH du lait sur l'activité coagulante :

Evolution de l'activité coagulante de la coagulase obtenue en fonction du pH du lait a été établie dans l'intervalle de 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 n°08 donne l'évolution de l'activité coagulante de l'extrait enzymatique de la pepsine ovine étudié en fonction de pH du lait.

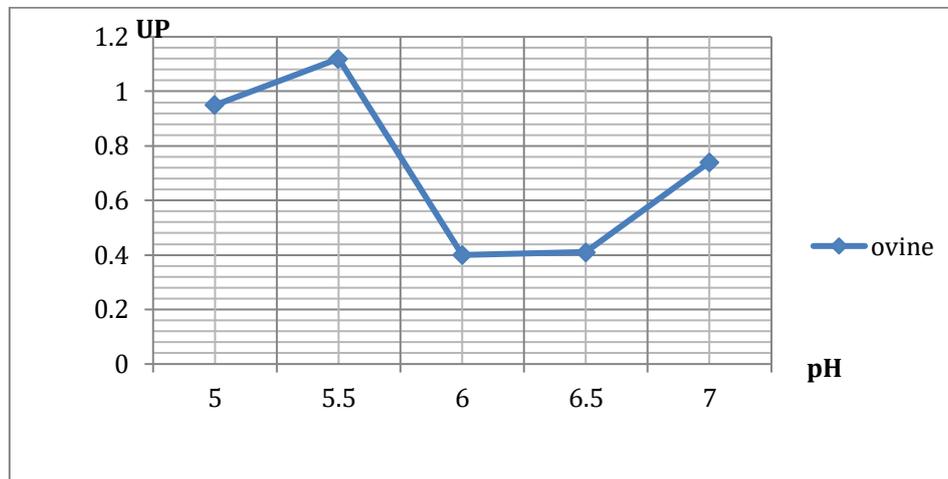


Figure 08 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de la pepsine ovine.

Les résultats présentés par la figure n°05 indiquent :

- la diminution de l'activité coagulante de la solution enzymatique avec l'augmentation de pH jusqu'à une presque inactivation à pH 7. Sachant que le temps de coagulation l'optimum d'activité a été observé à pH 5,5 ces résultats concorde avec ceux trouvés par Monsieur **Siar(2013)**.

A pH 7, l'activité coagulante des deux enzymes n'est pas complètement inhibée ils montrent encore une faible activité coagulante.

Gherian et al. (1995), ont rapporté que l'acidification du lait favorisait la réaction d'agrégation et réduisait la stabilité des micelles par la suite, ce qui était associé à la neutralisation des charges négatives et à la libération d'ions calcium.

Contrairement aux résultats trouvés par **Alias (2003)** qui rapporte que la pepsine ne coagule plus le lait au-dessus de pH 6,7 et la chymosine qui reste active vers pH 7,5.

Nos résultats sont cohérents avec ceux de **Slamani (2003)** et **Outaleb (2006)**, qui dans leur étude de la pepsine ovine ont montré que le temps de coagulation était plus court à pH

5,5, et **Benaïcha et Sahi (2009)** ont montré que le temps le plus court dans leur étude au cours de la même période le pH était de 5,2.

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

III.2.2. Influence de la température du lait sur l'activité coagulante :

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

La figure 09 : montre l'évolution de l'activité coagulante de l'extrait de la pepsine ovine.

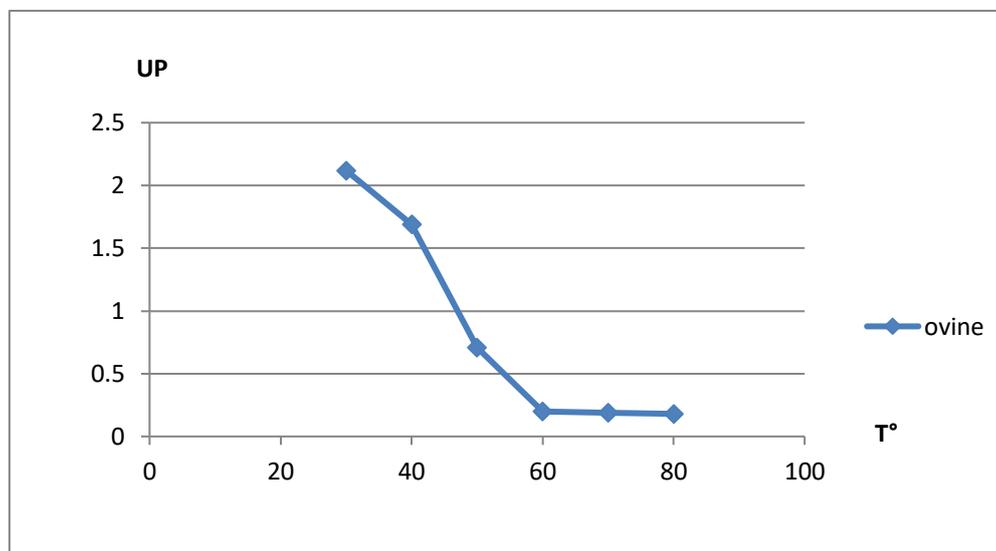


Figure 09 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de la pepsine ovine.

Les résultats indiquent que l'activité coagulante augmente progressivement avec la température jusqu'à atteindre un maximum à 50°C. L'activité coagulante diminue sensiblement à des températures supérieures à l'optimum enregistré, pour cela au-delà de 50°C on note une baisse de l'activité coagulante jusqu'à 60°C où on observe une perte totale de l'activité qui serait la conséquence d'une dénaturation complète de l'enzyme.

L'augmentation de l'activité coagulante est due à l'accélération de la réaction enzymatique par hydrolyse de la caséine κ . Selon **ADOUI (2007)**, la pepsine est inactivée aux températures dépassant 65°C.

D'après les résultats de **Slamani (2003) et Outaleb (2006)**, l'activité optimale d'un extrait enzymatique purifié de la pepsine ovine est de 50°C avec une inactivation complète à 60°C, ce qui confirme nos résultats.

Morsli (1996), a mentionné une activité maximale à 40°C pour un extrait coagulant de la pepsine du poulet.

L'évolution observée de l'activité enzymatique en fonction de la température résulte donc de deux phénomènes :

- L'activation thermique de la réaction hydrolyse
- La dénaturation thermique de l'enzyme

III.3. Immobilisation de la pepsine

Pour étudier l'influence de l'immobilisation sur l'activité coagulante de la pepsine active et non active ont été immobilisées et traitées à température ambiante, l'activité coagulante de ces deux enzymes a été mesurée.

Les résultats obtenus sont montrés dans **Tableau 04** et la silice obtenue après immobilisation des deux enzymes est montré dans **la figure 10** et **figure 11**.

Tableau 04: résultats obtenus lors de l'immobilisation

Enzyme	Active	Non active
Activité coagulante en seconde	5min et 59secondes	3min et 13secondes
Activité coagulante en UP	0,17	0,32



Figure 10 : représente la silice obtenue par l'immobilisation de la pepsine active



Figure 11 : représente la silice obtenue par l'immobilisation de la pepsine non active

Avant immobilisation l'activité coagulante de l'extrait enzymatique active (pepsinogène) a été maximale (100%) avec une valeur de 1.8UP, après immobilisation elle a diminué progressivement jusqu' a (10%) avec une valeur de 0.17UP, donc l'enzyme a perdu 90% de son activité.

Contrairement à l'activité coagulante de l'extrait enzymatique a l'état libre (non active) a 0% de l'activité coagulante car il n'a pas été activé par HCl, après immobilisation l'activité coagulante elle a augmenté jusqu'à 17%.

Par une simple comparaison entre la pepsine immobilisée non active et l'extrait enzymatique active (pepsinogène) avant son immobilisation, on remarque que l'activité coagulante de la pepsine non active est proche à celle de l'extrait enzymatique active (pepsinogène), donc l'immobilisation nous permet d'avoir les mêmes résultats que l'enzyme active.

L'amélioration de l'activité enzymatique après immobilisation due à la présence HCl dans le sol-gel.

Conclusion

Notre travail a porté l'extraction de la pepsine à partir de la caillette ovine dans le but d'étudier les caractérisations de cet extrait et ces propriétés coagulantes et protéolytique et tester la possibilité de son activité coagulante.

Notre approche comporte deux aspects, le premier est la récupération de la matière première qui contient le système enzymatique recherché, le second est la caractérisation de l'extrait, notamment sa teneur en protéines, son activité protéolytique et activité coagulante, sa force coagulante et les conditions optimales (température, pH).

Nos analyses bibliographiques des différents résultats nous a permet de savoir son activité protéolytique signifiante et considérable, nous a confirmé que la pepsine ovine qui a été obtenues par macération des caillette ovin coagule le lait à une température de 50C° et à PH 5.5 et elle est caractérisé par une force coagulante de l'ordre de 452.831 et une activité coagulant de 1.8 UP.

Pour conclure, on peut dire que les résultats obtenus semblent intéressants d'autant qu'ils montrent la possibilité d'obtention d'extrait enzymatique capables de remplacer la présure dans l'industrie fromagère.

La pepsine a été immobilisée sur la silice élaborée par le procédé sol-gel par technique d'inclusion pour vérifier la possibilité de son immobilisation, des travaux expérimentaux au sein de notre laboratoire ont été effectués.

Sur la base des résultats obtenus on conclue que la possibilité d'immobilisé la pepsine due au procédé sol-gel qui lui conféré une activité enzymatique stable.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. A.Bougatef, R. Balti, S. Ben Zaied, N. Souissi, M. Nasri, Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences, *Food Chem.* 107 (2008) 777–784, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.077>
2. A.R. Sielecki, A.A. Fedorov, A. Boodhoo, N.S. Andreeva, M.N.G. James, Molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8Å resolution, *J. Mol. Biol.* 214 (1990) 143–170, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90153-D](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90153-D).
3. Addou-Amara N. (2009). *Les Actinobactéries Thermo-halophiles : isolement, systématique et production de métabolites bioactifs*. Thèse de Doctorat. Université des sciences et des technologies Houari Boumedién .P : 19-22.
4. ADOUI F., (2007). *Extraction d'enzyme Coagulant le lait à partir des proventricules de poulet*. Mémoire magister. Univ. Mentouri Constantine. 64p.
5. Aksas A(2011)*Elaboration des nanocristaux semiconducteurs et étude de leurs propriétés structurales et optiques*. Travail de diplôme en vue de l'obtention d'un doctorat, physique des matériaux ,université A.Mira de Bejaia,P.116.
6. ALAIS C., (1974). *Principes des techniques laitières : science du lait*. Ed : Publicité, Paris. 513 p.
7. Alais, C., Linden, G., et Miclo, L. (2003). *Biochimie alimentaire*. 5ème édition de l'abrégé. Dunod, Paris.
8. Antonov, V.K., Ginodman, L.M., Kapitannikov, Y.V., Barshevskaya, T.N., Gurova, A.G., Rušmsh, L.D., 1978. Mechanism of pepsin catalysis: general base catalysis by the active-site carboxylate ion. *FEBS Lett.* 88, 87e90.
9. B.M. Dunn, Overview of pepsin-like aspartic peptidases, in: John E. Coligan (Ed.), *Current Protocols in Protein Science*, 2001, p. 25:21.3:21.3. 1-21.3.6
10. B.M. Dunn, Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases, *Chem. Rev.* 102 (2002) 4431–4458
11. B.Ozturk (2001) *Immobilisation of lipase Candida rugosa on hydrophobic and hydrophilic supports*, Master of science, Izmir Institute of Technology, Turkey :35-39
12. Bataille J. (2018). *Développement de stratégies d'analyse miniaturisée de biomarqueurs de la polyneuropathie amyloïde familiale à transthyrétine*. Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur en chimie ,université paris-Saclay,p.169.
13. Bayliss, R. S., Knowles, J. R., and Wybrandt, G. B. (1969) *Biochem. J.* 113, 377-386
14. 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.

Références bibliographiques

15. Bender, M. L., Bergeron, R. J., and Komiyama, M. (1984) *The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis*, Wiley, New York.
16. BENYAHIA-KRID F.A., ATTIA H., ZIDOUNE M.N., (2010). Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: Interactions and microstructure. *J. of Agriculture, Biotechnology and Ecology*, vol.3, pp: 75-86.
17. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254. 2.
18. Brady D.,Jordaan J.(2009). Advances in enzyme immobilisation *Biotechnologie Letters*,31:1639-1650.
19. BRENDA, PepsineA , 2022). <<http://www.brenda-enzymes.org>> (Accessed 18 January 2022)
20. Cahyaningrum S.E et Sianita M.M (2014).Immobilization of Pépsin onto Chitosan Silica Nanobeads with Glutaraldehyde as Crosslink agent ,*Bulletin of chemical Reaction Engineering & catalysis*,9(3) :263-269
21. Chen, K. C. S., andTang, J. (1972)5. *Biol. Chem.* 247,2566-2574
22. COPELAND, R. A. 2004. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, John Wiley & Sons.
23. Danson M.J., Hough D.W. – *Les enzymes de l’extrême*. BIOFUTUR, 1998, 179, 43-6.
24. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. Robert A. Copeland Copyright □ 2000 by Wiley-VCH, Inc. ISBNs: 0-471-35929-7 (Hardback); 0-471-22063-9 (Electronic)
25. Donald Voet, Judith G. Voet (1998), *Biochimie*, De Boeck Université, Bruxelles.
26. F.S. Mohseni-Shahri, F. Moeinpour, M. Nosrati, Spectroscopy and molecular dynamics simulation study on the interaction of sunset yellow food additive with pepsin, *Int. J. Biol. Macromol.* 115 (2018) 273–280
27. FAVIER J.C., (1985) *Composition du lait de vache-Laits de consommation*, <http://www.horizon.documentation.fr>
28. FRANWORTH E. et MAINVILLE I ., (2010) *Les produits laitiers fermentés et leur potentiel thérapeutique*, Centre de recherche et de développement sur les aliments, Saint-Hyacinthe. <http://www.dos.transf.edwa.pdf>.
29. G. E. Schulz, R.H. Schulz, R.H. Shirmer, *Principales of protein structure*, Springer-Verlag, New-York, 1979.
30. G.D. Altun, S.A. Cetinus, Immobilization of pepsin on chitosan beads, *Food Chem.* 100 (2007) 964–971, <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.11.005>.

Références bibliographiques

31. Garet G. (2014). Classification et caractérisation de familles enzymatiques à l'aide de méthodes formelles. Thèse de Doctorat. Université De Rennes 1.
32. Gildberg, Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates, *Com. Biochem. Phys. B* 91 (1988) 425–435.
33. Gole, A., Dash, C., Rao, M., Sastry, M., 2000. Encapsulation and biocatalytic activity of the enzyme pepsin in fatty lipid films by selective electrostatic interactions. *Chem. Commun.* 4, 297e298.
34. Gole, C. Dash, M. Rao, M. Sastry, *Chem. Commun.* 4 (2000) 297–298
35. Goursaud J., 1999. Réacteurs enzymatiques à enzymes libres et à enzymes immobilisées. In : scriban R. *Biotechnologie*. Paris, Lavoisier, pp.365-390.
36. GRANNER D.K., MURRAY R.K., RODWELL V.W., 2008. *Biochimie de HARPER*. 3e édition. De Boeck. Bruxelles., pp. 49-51, 483.
37. GROVES (M.R.), DHANARAJ (V.), BADASSO (M.), NUGENT (P.), PITTS (J.E.), HOOVER (D.J.) et BLUNDELL (T.L.). – A 2.3 Å resolution structure of chymosin complexed with a reduced bond inhibitor shows that the active site beta-hairpin flap is rearranged when compared with the native crystal structure. *Protein Eng.*, 11, p. 833-840 (1998).
38. Hamdan S.(2009).studies of thépréparation and use of Sol - Gel for *Enzyme Immobilisation and Analytical Application* . Travail de diplôme en vue de l'obtention du diplôme Master , université de Tennessee Est ,p,88.
39. Han W., Yamauchi M.,HasegawaU.,NodaM.,FukuiK.,van der VliesAJ.,Uchiyama S. et Uyama H.(2015) .Pepsineimmobilisation on an aldehyde-modified polymethacrylate monolith and its application for protein analysis .*Journal of Bioscience and Bioengineering* ,119 (5) :505-10
40. Hartsuck, J. A., and Tang, J. (1972) *J. Biol. Chem.* 247,2575-2580
<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.05.019>.
41. Huang, W.-Y., andirang, J. (1972) *J. Biol. CiLem.* 247,2704-2710
42. HUPPERTZ T., UPADHYAY V.K., KELLY A.L. et TAMIME A.Y., (2006). *Constituents and Properties of Milk from Different Species. Brined Cheeses*. Edited by Dr Adnan Tamime. Copyright © 2006 by Blackwell Publishing Ltd. Pp 1-34.
43. I.J. Vervaeke, N.A. Dierick, D.I. Demeyer, J.A. Decuyper, Approach to the energetic importance of fibre digestion in pigs. II. An experimental approach to hindgut digestion, *Anim. Feed Sci. Technol.* 23 (1989)169–194, [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(89\)90096-5](https://doi.org/10.1016/0377-8401(89)90096-5).

Références bibliographiques

44. J. Zhang, W. Liu, L. Fang, R. Gu, J. Lu, G. Li, Effect of acid and in vitro digestion on conformation and IgE-binding capacity of major oyster allergen Cra g 1 (tropomyosin), *Allergol. Immunopathol.* 48 (2020) 26–33, <https://doi.org/10.1016/j.aller.2019.08.001>.
45. J.S. Fruton, A history of pepsin and related enzymes, *Q. Rev. Biol.* 77 (2) (2002) .
46. Jaeger, K.E. and Eggert, T. (2004) Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Current Opinion in Biotechnology* 15(4),305-313
47. Jarrar H.(2011).*Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles*.Thèse de doctorat Pour obtenir le grade de docteur de l'école nationale supérieure de chimie, université de Montpellier.
48. Jeantet, R. (2006). *Science des aliments: biochimie, microbiologie, procédés, produits: Tec & Doc.*
49. K. Forssmann, L. Meier, B. Uehleke, C. Breuer, R. Stange, A non-interventional, observational study of a fixed combination of pepsin and amino acid hydrochloride in patients with functional dyspepsia, *BMC Gastroenterol.* 17 (2017).
<https://doi.org/10.1186/s12876-017-0675-9>.
50. K.-U. Petersen, Pepsin and its importance for functional dyspepsia: relic, regulator or remedy? *Dig. Dis.* 36 (2018), <https://doi.org/10.1159/000481399>.
51. Kademi A., Ismaili-Alaoui M., Houde A. – « Des arômes synthétiques... au naturel ». *Le Monde alimentaire*, 2001, 5(5),17-19.
52. Kecskemeti G.,Kresz N.,Smauz T.,Hopp B. et Nogradi A .(2005) .Pulsed laser déposition of pepsinthin films .*Applied surface science*,247(1-4):83-88
53. Kornberg A (1987) The two cultures: chemistry and biology. *Biochemistry* 26:6888–S5.
54. L.PENASSE (1974) *Les enzymes : Cinétique et mécanisme d'action*. Paris, Masson et Cie.58-106 .
55. LIBOUGA D.G., VERCAIGNE-MARKO D., DJANGAL S. L., I. CHOUKAMBOU, EBANGI A.L., M. OMBIONYO, BEKA R.G., ABOUBAKAR T.M. et GUILLOCHON D., (2006). Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*. *Tropicultura*.
56. Livrage J.(2000).Les procédés sol-gel –the sol-gel process .*Revue VERRE*,6(5) .
57. LOWRY O. M., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R.J., (1951). Protéine measurement with the folinphénol reagent, *J. Daisy sci.* 193: 265-275
58. M Kademi A., Ismaili-Alaoui M., Houde A. – « Des arômes synthétiques... au naturel ». *Le Monde alimentaire*, 2001, 5(5), 17-19iron, Marina Mironchik, David Mirelman, Meir Wilchek and AharonRabinkov. – Inhibition of tumor growth by a novel approach: In situ allicin generation using targeted alliinase delivery. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2, 1295-1301.

Références bibliographiques

59. M. Fujinaga, M.M. Chernaia, S.C. Mosimann, M.N. James, N.I. Tarasova, Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin, *Protein Sci.* 4 (5) (1995) .
60. Mathieu J 1998 Initiation à la physicochimie du lait. Guides Technologiques des IAA. Edition Lavoisier Tec et Doc, Paris. 222 p
61. Matoub L., 2000.Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale de *Bacillus subtilis* sélectionnée (LC 33). Mém.Mag.Agr.,Institut National Agronomique, El Harrach (Alger), 91p.
62. Meriodor D et Gedanken A.(2014).Enhanced Activité of Immobilized Pépsin Nanoparticles Coated on Solide Substrates Compared to Free pépsin.*Enzyme and Microbial Technology*,67-67-76
63. MEUNIER, N.E., 1999.Valuation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales.M.ScThesis, INRSETE, Univ. Quebec. Canada.pp.1-168 .
64. Morellon-Sterling, O. Tavano, J.M. Bolivar, A. Berenguer-Murcia, G. VelaGutiérrez, J.S.M. Sabir, V.G. Tacias-Pascacio, R. Fernandez-Lafuente, A review on the immobilization of pepsin: a Lys-poor enzyme that is unstable at alkaline pH values, *Int. J. Biol. Macromol.* (2022), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.224>.
65. Morsli A, 1996.Recherches sur les activités protéasiques des extraits de cynarascolymus, du latex de *Ficus carica* et du pro ventricule de *Gallus gallus* en vue de leur utilisation en technologie fromagère. Thèse Magister. INA. EL-Harrach(Alger).p.p 181-190.biocapteurs
66. NOBLE J.E., et BAILEY M.J.A., (2009). Quantitation of protein. *Methods in enzymology*.
67. NOUANI A., DAKO E., MORSLI A., BELHAMICHE N., BELBRAOUE T S., BELLAL M.M. et DADIE A., (2009). Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynarascolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J. Food Technol.*, 7: 20-29.
68. NOUANI A., HAMRANI L., BELLAL M. M., (2011). Purification et caractérisation de protéase coagulant le lait extraite à partir du proventricule de poulet (*Gallusgallus*). Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 29 et 30 mars 2011.
69. O. Azdad, N. Mejrhit, L. Aarab, Reduction of the allergenicity of cow's milk α -lactalbumin under heat-treatment and enzymatic hydrolysis in Moroccan population, *Eur Ann Allergy ClinImmunol* 50 (2018) 177, <https://doi.org/10.23822/EurAnnACI.1764-1489.60>
70. O. Azdad, N. Mejrhit, L. Aarab, The effect of treatments on the allergenicity of β lactoglobulin in Moroccan population, *Nutr. Food Sci.* 48 (2018) <https://doi.org/10.1108/NFS-11-2017-0250>.

Références bibliographiques

71. O. dheyauldeensalahldin, D. Alrawi, H. k Buniya, Partial purification of pepsin enzyme produced by *Staphylococcus sciuri* and *Pythium* sp. using whey, *Mater. Today Proc.* (2021), <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2021.04.365>.
72. O.C. Aszmann, *J. Reconstr. Microsurg.* 16 (2000) .
73. OHAK, 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.
74. Outaleb T., 2006. Aptitude à la coagulation du lait par la pepsine ovine. *Mém.Ing.Agr.*, Institut National Agronomique, El Harrach (Alger), 54p.
75. Palma-Albino, A. Intiquilla, K. Jiménez-Aliaga, N. Rodríguez-Arana, E. Solano, E. Flores, A.I. Zavaleta, V. Izaguirre, B. Hernandez-Ledesma, ' Albumin from *Erythrina edulis* (pajuro) as a promising source of multifunctional peptides, *Antioxidants* 10 (2021) 1722, <https://doi.org/10.3390/antiox10111722>.
76. Pelmont J.; *Enzymes : catalyseurs du monde vivant*. Presse Universitaire de Grenoble, 1995, 7, 652–654.
77. Peter F.,Poppe L.,KissC.,Szocs-Biro E.,Preda G.,Zarcula C., et Olteu A. (2005).influence of precursors and additives on microbial lipases stabilized by sol-gel entrapment.*Biocatalysis and Biotransformation*,23(3/4) .
78. Q. Luo, D. Chen, R.M. Boom, A.E.M. Janssen, Revisiting the enzymatic kinetics of pepsin using isothermal titration calorimetry, *Food Chem.* 268 (2018) 94–100, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.042>.
79. R. Cooke,I.D. Kuntz, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1974 ,3
80. R. Morellon-Sterling, O. Tavano, J.M. Bolivar, A. Berenguer-Murcia, G. VelaGutiérrez, J.S.M. Sabir, V.G. Tacias-Pascacio, R. Fernandez-Lafuente, A review on the immobilization of pepsin: a Lys-poor enzyme that is unstable at alkaline pH values, *Int. J. Biol. Macromol.* (2022), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.224>.
81. Raisonnier A. - Digestion – Détoxification Université Paris-VI faculté de médecine pierre et marie curie 21 janvier 2004.
82. Rajagopalan, T. G., Moore, S., and Stein, W. H. (1966) *J. Biol. Chem* 241, 4940-4950
83. RAMET J.P., (1985). Study of enzymatic coagulation of camel milk in Saudia-Arabia. Mission Report. FAO.
84. RAMET J.P., (1997). Les agents de transformation du lait in *Le fromage*, 3eme édition, Tech. & Doc. Paris.
85. Richardson, G.H. (1975) Rennin and the formation of milk curd In: *Enzymes in food processing*. Ed., G.Reed.Academicpress,

Références bibliographiques

86. Robert J. Whitehurst And Maarten van Oort : Enzymes in Food Technology. 2nd edition willeyBlackwell, 2010.
87. S. Choyam, P.M. Jain, R. Kammara, Characterization of a potent new-generation antimicrobial peptide of bacillus, *Front. Microbiol.* 12 (2021), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.710741> (<https://www.frontiersin.org/article/>).
88. S.N. Mazloomi, A.S. Mahoonak, L. Mora, M. Ghorbani, G. Houshmand, F. Toldra, Pepsin Hydrolysis of orange by-products for the production of bioactive peptides with gastrointestinal resistant properties, *Foods* 10 (2021), <https://doi.org/10.3390/foods10030679>.
89. Schiraldi C., De Rosa M. – The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *TRENDS in Biotechnology*, 2002.
90. Sirisiha V.L., Jain A., Jain A. (2016). Enzyme Immobilization An Overview on Méthodes ,support Matériel ,and application of Immobilized Enzyme .*Advances in FOOD and Nutrition Research*,79:179-211
91. 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.
92. Sosalagere, B. AdesegunKehinde, P. Sharma, Isolation and functionalities of bioactive peptides from fruits and vegetables: a reviews, *Food Chem.* 366 (2022), 130494, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130494>.
93. Szalapata K ., Osinsk –Jaroszuk M., Bryjak J ., Jaszek M et Jarosz –Wilkolazka A.(2016) .Nouvel application porous and cellular matériels for covalent Immobilization of Pépsin .*Brazilian Journal of Chemical Engineering* , 33(02) : 251–260
94. T. Kageyama, Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure function, evolution, and development, *Cell Mol. Life Sci.* 59 (2002) 288–306
95. Tanford, *Chemistry of Macromolecules*, Wiely, New-york,1961
96. Tang, J. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 4510-4517
97. Tang, J., Huang, W-Y., Sepulveda, P., Chen, K. C. S., Marciniszyn, J., Jr., Tao, N. & Liu, D. (1973) *Fed. Proc.* 32, 2035.
98. TSOULI J., (1979). Etude d'une protease coagulante extraite de *Cynarascolymus* et de *Cynaracardunculus*, adaptation de la méthode conductimétrique pour la détermination du temps de coagulation du lait et le contrôle des fabrications. *Doctorates-sci.*, Univ. C. Bernard, Lyon, 1-62.
99. V.K. Antonov, L.M. Ginodman, Y.V. Kapitannikov, T.N. Barshevskaya, A.G. Gurova, L.D. Rumsh, *FEBS Lett.* 88 (1978) 87–90.

Références bibliographiques

100. VALLES et FURET, (1977). Etudes des caillettes des bovins à l'état ruminants pour l'obtention d'extrait coagulants à base de pepsine bovine ; méthode d'extraction. Lait, 61 : 601-617.
101. W. Hartmeier, Immobilized pepsin: properties and use to prevent haze formation in beer and wine, *Biotechnol. Lett.* 1 (1979) 225–230.
102. W.N. Baba, B. Baby, P. Mudgil, C.-Y. Gan, R. Vijayan, S. Maqsood, Pepsin generated camel whey protein hydrolysates with potential antihypertensive properties: Identification and molecular docking of antihypertensive peptides, *LWT* 143 (2021), 111135, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111135>.
103. Y.-M. Wang, X.-Y. Li, J. Wang, Y. He, C.-F. Chi, B. Wang, Antioxidant peptides from protein hydrolysate of skipjack tuna milt: Purification, identification, and cytoprotection on H₂O₂ damaged human umbilical vein endothelial cells, *Process Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.008>.
104. ZHai Q.Z et Sun S.J,(2014),préparation ,characterization ,and Luminescence of (S BA _15) Immobilières Pépsin.*Russian Journal of physical chemistry A*,88(12) :2243-2251

Résumé:

La pepsine est l'une des enzymes industrielle les plus importantes, notamment dans l'industrie fromagère due à son activité coagulante.

Afin de découvrir ses caractéristiques et tester son activité coagulante nous avons procédé à extraire cette enzyme à partir des caillettes ovine, après extraction les conditions optimales d'activité de la coagulase ont été déterminés ($T^{\circ} : 50^{\circ}$, Ph5.5).

L'extrait enzymatique présente une stabilité à des températures inférieure à 50° , dans l'intervalle de Ph comprise entre 3 et 5.5, et conserve son activité au d'un stockage à basse température (-18°C).

Dans ce travail on a étudié la possibilité d'immobiliser la pepsine dans une matrice de silice élaborée par le procédé sol gel par la technique d'inclusion .Les résultats de l'activité coagulante de la pepsine immobilisée a l'état libre ont démontré que son activité a été amélioré après immobilisation avec un pourcentage de 17%,contrairement à l'activité de l'extrait enzymatique active qui a perdu 90% de son activité après immobilisation.

Abstract

Pepsin is one of the most important industrial enzymes, especially in the cheese industry due to its coagulant activity.

In order to discover its characteristics and test its coagulant activity, we proceeded to extract this enzyme from ovine abomasum, after extraction the optimal conditions for coagulase activity were determined ($T^{\circ} : 50^{\circ}$, Ph5.5).

The enzymatic extract has stability at temperatures below 50° , in the pH range between 3 and 5.5, and retains its activity in storage at low temperature (-18°C).

In this work, we studied the possibility of immobilizing pepsin in a silica matrix produced by the sol gel process by the inclusion technique. The results of the coagulant activity of pepsin immobilized in the free state demonstrated that its activity was improved after immobilization with a percentage of 17%, unlike the activity of the active enzymatic extract which lost 90% of its activity after immobilization.

ملخص

يعتبر البيبسين من أهم الإنزيمات الصناعية وخاصة في صناعة الجبن لما له من نشاط تخثر. من أجل اكتشاف خصائصه واختبار نشاطه في التخثر ، شرعنا في استخراج هذا الإنزيم من إنزيم الغنم ، بعد الاستخراج تم تحديد الظروف المثلى لنشاط تجلط الدم. ($T^{\circ} : 50^{\circ}$, Ph5.5) يتمتع المستخلص الأنزيمي بالثبات عند درجات حرارة أقل من 50° درجة. في نطاق الأس الهيدروجيني بين 3 و 5.5، ويحتفظ بنشاطه في التخزين عند درجة حرارة منخفضة -18° مئوية. (

درجة

في هذا العمل ، درسنا إمكانية تجميد البيبسين في مصفوفة السيليكا التي تنتجها عملية هلام محلول غرواني بتقنية التضمين وأظهرت نتائج نشاط تخثر البيبسين المثبت في الحالة الحرة أن نشاطه قد تحسن بعد التثبيت بنسبة مئوية 17%. بعكس نشاط المستخلص الأنزيمي الفعال الذي فقد 90% من نشاطه بعد الشلل.