

**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 des Sciences Alimentaires**  
**Filière : Sciences Alimentaires**  
**Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire**



**Mémoire de fin de cycle en**  
**vue de l'obtention du diplôme de**  
**MASTER**

Option : Qualité des produits et sécurité alimentaire

**Thème**

**Recherche de succédanés d'origine animale ou végétale  
de la présure**

**Présenté par :**

**M<sup>elle</sup> SAIDI ASMA**

**M<sup>elle</sup> ZENNAD TINHINANE**

**Jury**

**Président : M<sup>me</sup> TIMZI née Fella S.**

**Maitre de Conférences B**

**Promoteur : M<sup>r</sup> BOUKHALFA F.**

**Maitre de Conférences A**

**Examineur : M<sup>elle</sup> TAZRART K.**

**Maitre de Conférences B**

**Année universitaire : 2020 / 2021**

# *Remerciements*

*Avant tout, on tient à remercier celui qui nous a créés, aidés et celui qui nous a donné la force et la patience et le courage pour pouvoir accomplir notre mémoire. En disant « Dieu merci »*

*On tient particulièrement à exprimer notre profonde gratitude à Mr BOUKHALFA Farid pour ses orientations et sa patience, tout au long de ce travail nous somme reconnaissante.*

*Nous adressons nos remerciements les plus respectueux aux membres de jury pour le grand honneur qu'ils nous font en acceptant d'examiner ce mémoire.*

*Nous citons madame TIMZI Samira, Présidente de jury  
Madame TAZRART Karima, examinatrice de ce mémoire  
Nous exprimons notre reconnaissance à tout le personnel du laboratoire de nutrition, à leur tête madame Sadia pour leur aide technique et scientifique ainsi pour leur disponibilité et gentillesse.*

*Je remercie aussi, tous ceux et toutes celles qui m'ont aidé ou encouragé, à quelques titres ou degrés que ce soit, à entreprendre et à achever ce mémoire.*

# *Dédicaces*

*À ma très chère mère Yamina. Qui s'est tant sacrifiée pour les  
besoins de nos études,*

*À mon très cher père Blkacem pour tous les efforts consentis afin de  
nous armer du savoir,*

*Et je témoigne mon respect, ma profonde gratitude et beaucoup de  
reconnaissance pour tout ce qu'ils ont faits pour moi.*

*À la mémoire de mon cher khalî, Ali bey El Mouhoub, que Dieu  
l'accueille dans son vaste paradis et que son âme repose en paix.*

*À mes chers frères (Nassim, Mouhamed, Omar, Kamel, Nabile et  
Alilou)*

*À mes chères sœurs Meriem, Dyhia et son époux Koucila*

*À mes belles-sœurs (Samia, Rebiha et Kahina)*

*À mes nièces et neveux (Merina, Nilia, Malak , Serine, Aylan,  
Dania et Youce) que j'aime énormément*

*À toute ma belle-famille un par un*

*À ma meilleure amie Samira et sa petite famille (Massi et Céline)*

*A mon cher fiancé Abdelhak qui m'a motivé et soutenue tout au  
long de ce travail.*

*TINHINANE.*

*À ma très chère mère Sabah. Qui s'est tant sacrifiée pour les  
besoins de nos études,*

*À mon très cher père Moussa. Pour tous les efforts consentis afin  
de nous armer du savoir,*

*Et je témoigne mon respect, ma profonde gratitude et beaucoup  
de reconnaissance pour tout ce qu'ils ont faits pour moi.*

*À mes chères sœurs (Youssra et Hiba) pour leur affectueux  
soutien moral*

*À mes chers frères (Oussama, Zakí et surtout mon petit ange  
Ahmed)*

*À la mémoire de mes grands-parents (paternels Hocine Et Aicha,  
maternels Rabah Et Zineb). Que Dieu les accueille dans son  
vaste paradis et que leur âme repose en paix.*

*À mes chères tantes du côté de ma mère (Khalti Mounira et  
Kamila)*

*À mes chères tantes du côté de mon père (Farida Et Mounira)  
ASMA.*

## Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction .....	1
<b>Partie bibliographique</b>	
I. Généralités sur le lait .....	3
I.1 Le lait .....	3
I.2 Composition chimique du lait .....	3
I.3 Paramètres physico-chimiques du lait .....	4
I.4 Les caséines du lait .....	4
I.5 Coagulation du lait .....	6
I.6 Les enzymes coagulants du lait .....	8
I.7 Effet des paramètres physico chimique sur la coagulation du lait .....	9
I.8 Les succédanés de présure .....	10
<b>Partie expérimentale</b>	
<b>Matériel et Méthodes</b>	
I. Matériel et méthodes .....	14
I.1 Matériel végétal .....	14
I.2 Extraction et préparation des extraits enzymatiques .....	16
I.3 Caractérisation physico-chimique de l'extrait brut .....	16
I.4 Mesure des activités enzymatiques .....	18
I.5 Étude des paramètres influençant l'activité enzymatique .....	21
<b>Résultats et discussion</b>	
I. Caractérisation physico-chimique des pepsines végétales et animale .....	23
Conclusion et perspectives .....	32
Références bibliographiques .....	34
Annexes .....	42

**Liste des abréviations**

**BSA** : Bovin Sérum Albumine

**CEE** : Centre d'Etudes et d'Emploi

**FAO** : Food and Agriculture Organization

**FIL** : Fédération Internationale du Lait

**ISO** : International Standard Organization (Organisation internationale de standardisation)

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**MG** : Matière Grasse

**Phe** : Phénylalanine

**Q** : Volume d'extrait coagulant

**Sec** : Seconde

**Tc** : Temps de coagulation

**TCA** : Acide Trichloracétique

**UAC** : Unité d'activité coagulante

**UP** : Unité présure

Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>N° 1</b>	Schéma illustrant les micelles de caséines	<b>5</b>
<b>N° 2</b>	Photographie des trois succédanés d'origine végétale étudiés a : <i>Cynara cardunculus</i> b : <i>Galactites tomentosa</i> c : <i>Pélargonium gravelons</i>	<b>14</b>
<b>N° 3</b>	Photographie de la caille Montagnier étudié et de l'appareil digestif	<b>15</b>
<b>N° 4</b>	Représentation graphique de l'influence du pH sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.	<b>26</b>
<b>N° 5</b>	Représentation graphique de l'influence de la concentration du CaCl <sub>2</sub> sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.	<b>28</b>
<b>N° 6</b>	Représentation graphique de l'influence de température sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.	<b>30</b>

**Liste des tableaux**

<b>Tableaux</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>N° 1</b>	Composition moyenne du lait entier ( <b>Fredot, 2005</b> )	<b>3</b>
<b>N° 2</b>	Caractéristiques physicochimiques des extraits enzymatiques étudiés	<b>23</b>

# *Introduction*

Le lait ou le produit noble est à la base de l'alimentation de tous les mammifères, y compris l'Homme. Il est consommé depuis des millénaires par les populations de tous les pays à travers le monde. Il possède une image très positive, associée à la vie et à la croissance. De ce fait, sa conservation était primordiale, et les premières transformations laitières en fromage sont apparues (**Jeantet et al, 2008**).

La fabrication du fromage est apparue il y a 8000 ans, peu après la domestication des animaux. A l'origine, l'intérêt majeur de la transformation du lait en fromage était de conserver les principaux constituants du lait. Aujourd'hui, il s'agit plutôt d'un aliment, possédant des qualités nutritionnelles indéniables (**Jeantet et al, 2017**).

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

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

L'utilisation de cette enzyme est confrontée à la contrainte majeure du sacrifice de jeunes veaux et donc d'obtention de quantités de plus en plus importantes d'enzymes susceptibles de répondre à des besoins sans cesse croissants. En effet, depuis quelques années, on note une baisse progressive de la disponibilité de la présure ainsi qu'une élévation de son prix.

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

Selon l'Office National des Statistiques (2012), la production de l'industrie fromagère en Algérie est passée de 20 milles tonnes en 2006 à 30 milles tonnes en 2011, avec une consommation moyenne de 0,6 Kg/habitant/an en 2006 à 0,7

Kg/habitant/an en 2011 (ONS, 2012). L'importation totale de la présure traditionnelle ou de ses succédanés d'origine microbienne en Algérie est d'environ 1,5 tonne par an. Cette quantité coûte approximativement 102 000 \$, somme équivalente à 7,5 millions de DA

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

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la recherche de nouvelles sources de protéases disponibles à moindre coût, à partir de plantes endémiques du sol algérien. Pour cela, nous avons réalisé une étude en deux parties. La première est une étude bibliographique et la seconde est une partie pratique divisé en deux sections, à savoir matériel et méthodes et discussion des résultats.

Dans de la partie bibliographie, un aspect général est donné pour les trois principaux volets ; le lait, le fromage, la coagulation du lait et les succédané de la présure

Au cours de la partie pratique, la collecte des matières premières (végétale et animale), l'extraction et caractérisation de la pepsine, ainsi que la présentation des différents résultats obtenus et leurs discussions a été illustrées.

L'étude est finalisée par une conclusion générale est des perspectives pour compléter la présente étude.

## *Partie bibliographique*

## I. Généralités sur le lait

### I.1 Le lait

Selon le Congrès International pour la Répression des Fraudes Alimentaires, tenu à Genève en 1908, « Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum » (**Bourjois et Larpent, 1981**).

### I.2 Composition chimique du lait

Le lait est composé d'une matière majoritaire l'eau, de protéines azoté et non azoté, de glucides, d'acide gras, de vitamines et de minéraux. La composition moyenne du lait est représentée dans le tableau suivant :

**Tableau I** : Composition moyenne du lait entier (**Fredot, 2005**).

Composants	Teneurs (g/100g)
<i>Eau</i>	<i>89.5</i>
<i>Dérivés azotés</i>	<i>3.44</i>
<i>Protéines</i>	<i>3.27</i>
<i>Caséines</i>	<i>2.71</i>
<i>Protéines solubles</i>	<i>0.56</i>
<i>Azote non protéique</i>	<i>0.17</i>
<i>Matières grasses</i>	<i>3.5</i>
<i>Lipides neutres</i>	<i>3.4</i>
<i>Lipides complexes</i>	<i>&lt;0.05</i>
<i>Composés liposolubles</i>	<i>&lt;0.05</i>
<i>Glucides</i>	<i>4.8</i>
<i>Lactose</i>	<i>4.7</i>
<i>Gaz dissous</i>	<i>5% du volume du lait</i>
<i>Extrait sec total</i>	<i>12.8 g</i>

Le lait est un aliment complet, très essentiel pour la santé de l'homme. Il contient des éléments nutritifs essentiels pour l'équilibre et le développement d'organismes vivants. La composition du lait est caractérisée par une grande complexité dans la nature et la forme de ses composants. Ces derniers sont particulièrement adaptés aux besoins nutritionnels et aux possibilités digestives du jeune animal, qui y trouve tous les éléments nécessaires à sa croissance.

### **I.3 Paramètres physico-chimiques du lait**

L'acidité industrielle du lait s'apprécie par la valeur du pH, qui renseigne sur l'état de fraîcheur du lait. Pour le cas de la traite, le pH du lait est compris entre 6,6 et 6,8 et reste longtemps à ce niveau. Toute valeur située en dehors de ces limites indique un cas anormal ; soit une maladie ou anomalie qui a touché les mammites.

La densité du lait le plus souvent varie selon l'espèce et la nutrition de l'animal, car elle dépend de la richesse du lait en éléments essentiels comme les vitamines, la matière azotée et non azotée, ainsi que la matière grasse.

La densité du lait fraîchement extrait de la mamelle est instable et tend à augmenter avec le temps (**Seydi, 2004**).

L'ébullition du lait est atteinte au seuil de 95°C, très proche de celle de l'eau. Au cours de l'ébullition, il se forme une couche très dense à la surface du lait constituant la membrane protéino-calcaire ou peau du lait (frangipane) qui gêne l'ébullition du lait (**Boivert, 1980**), d'où la nécessité de l'éliminer pour un meilleur traitement thermique.

Le point de congélation du lait est presque le même que celui de l'eau. Il est compris entre 0,530 et -0,5750 °C en fonction de la saison et de l'espèce. Le mouillage rapproche le point de congélation de 0 °C, l'écémage ne modifie pas le point de congélation. Cependant, l'acidification lactique et l'addition de sels solubles l'abaissent (**Aliais, 1984**).

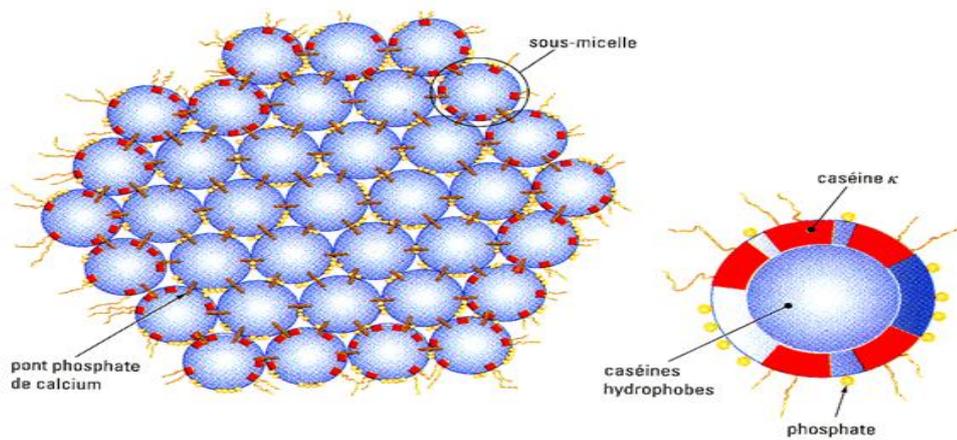
### **I.4 Les caséines du lait**

Les caséines représentent les protéines majoritaires (80 %) du lait. Ces dernières sont responsables du changement de l'état du lait, autrement dit sa coagulation et par conséquent la formation de nouveaux aliments, nouveaux produits, nouvelles saveurs et

arômes.

Les caséines (**Figures N° 1**) se composent de trois fractions (alpha  $\alpha$ , bêta  $\beta$  et kappa  $\kappa$ ) et existent sous la forme d'une suspension colloïdale.

Elles sont organisées en micelles, qui sont des agrégats de plusieurs molécules ou complexe de protéines et phosphore, précipitant à pH 4,6 pour former un gel très dense et la précipitation des matières non azotées dans un liquide aqueux appelé lactosérum. (**Visser S. 1981; Brulé et al, 1997**)



**Figure N°1** : Schéma illustrant les micelles de caséines

Les micelles n'ont pas les mêmes dimensions, ni la même composition. Les grosses micelles ont une charge minérale plus élevée et des proportions de caséines  $\beta$  et  $\kappa$  plus faibles que les petites micelles (**Brulé et al, 1997**).

La présence de phosphore sous la forme de groupements phosphoséryls, la forte proportion de résidus apolaires en outre le caractère hydrophobe. La présence des groupements phosphoséryls confère aux caséines une très grande affinité vis-à-vis du calcium, du magnésium et des oligoéléments.

Dans le cas des caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , et  $\beta$ , qui sont hautement phosphorylées, les sites phosphorylés sont en majeure partie groupés, ce qui a pour conséquence de créer dans la chaîne peptidique des zones à caractère acide et hydrophile très marqué. (**Remeuf et al, 1991**).

Un lait riche en caséine  $\beta$ , par exemple, donne un gel présure plus ferme (**Remeuf et al, 1991**). Ainsi, la teneur en caséine  $\kappa$  et la taille des micelles

apparaissent comme des paramètres essentiels dans les aptitudes fromagères d'un lait (Mcneill et Donnely, 1987 ; Remeuf et al, 1991 ; Hallen et al, 2010).

Les différentes formes d'un type de caséine se distinguent par leur composition, en particulier, le nombre de groupements phosphate (Matieu, 1998 ; Creamer, 2002). La caséine k, bien que non-majoritaire dans la micelle est la protéine laitière de loin la plus étudiée, car elle détient le rôle clef dans la coagulation du lait par la présure.

La stabilité des micelles de caséines est établie par deux étapes :

- La charge de surface : les caséines ont un caractère acide, chargées qui donne une forte répulsion.
- Le degré d'hydratation : la fixation de l'eau sur les micelles constitue une enveloppe d'hydratation protectrice. La caséine kappa qui porte les charges négatives et le caractère hydrophile de la micelle, constitue ainsi la tête hydrophile. Tout changement bouleversant l'équilibre entre les forces attractives et répulsives conduit à la formation du gel par l'agrégation des micelles (Mouranche et Costes, 1984).

### I.5 Coagulation du lait

La coagulation du lait est la dénaturation de la caséine du lait sous l'action d'acidification ou par action d'enzyme spécifique présure ou la combinaison des deux actions.

La coagulation acide du lait est réalisée avec la présence des acides ou des ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique, qui entraîne la baisse du pH provoquant un changement de l'état des micelles des caséines : une diminution progressive de la charge ionique des micelles qui devient nulle et une solubilisation du phosphate de calcium micellaire qui provoque une dissolution des micelles et la formation du gel (petit lait). Ce processus entraîne l'hydratation et la formation des caséines modifiée, qui se relie entre elles par des liaisons hydrophobes.

La coagulation mixte du lait résulte de l'action conjuguée d'une enzyme spécifique et de l'acidification. La multitude de combinaisons conduisant à différents états d'équilibre spécifiques est à l'origine de la grande diversité des fromages à pâte molle et à pâte pressée non cuite.

La coagulation enzymatique du lait peut être considérée comme étant la meilleure façon d'obtenir un fromage de meilleure qualité et par apport aussi au rendement et efficacité. Généralement, cette coagulation est obtenue à l'aide d'une protéase comme la présure en deux phases : phase enzymatique et phase de coagulation.

### ➤ La phase primaire

La stabilité des micelles de caséine dans le lait sous forme de dispersion colloïdale est attribuée à leur charge négative nette induisant des forces électrostatiques répulsives et aux répulsions stériques entre les régions flexibles des macro-peptides de caséine  $\kappa$ . En outre, les spots calciques entre les molécules de caséine, les liaisons hydrogènes et les forces de Van der Waals contribuent également dans cette stabilité (**Schmidt, 1982**).

La couche externe de la micelle est principalement constituée de caséine  $\kappa$  avec son segment C-terminal hydrophile libre qui s'étend dans la phase aqueuse du lait assurant la stabilité stérique et agissant comme une barrière contre l'association des micelles. La présure va hydrolyser la caséine  $\kappa$  au niveau de la liaison peptidique (Phe105-Met106) pour donner deux fragments : la para caséine  $\kappa$  et le caséino macro peptide (CMP) ou le glyco macro peptide (GMP) s'il est fortement glycosylé (**Mahaut et al, 2000 ; Vignola, 2002 ; Anema et al, 2005**).

Cette hydrolyse entraîne une réduction de la charge négative et des répulsions stériques de telle sorte que les micelles de caséine deviennent susceptibles à l'agrégation (**Lucey, 2002**).

### ➤ La phase secondaire

Lors de cette phase, les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes par intervention des ions calcium qui s'unissent à la partie chargée négativement des micelles diminuant ainsi les forces de répulsion électrostatiques auxquelles elles sont soumises, ce qui favorise leur agrégation (**Holt, 1997 ; Mietton et al, 2004**).

La coagulation se produit seulement en présence d'une quantité suffisante de calcium et de phosphate colloïdal. C'est une réaction irréversible qui produit un gel souple : le caillé de présure avec formation d'un gel aqueux nommé lactosérum. (**Holt, 1997 ; Mietton et al, 2004**)

### **I.6 Les enzymes coagulants du lait**

La coagulation enzymatique du lait est obtenue sous l'action d'une protéase. Cette dernière peut être de différentes origines ; animale, végétale ou microbienne.

Les enzymes coagulants d'origine animale sont des protéases gastriques. Les plus employés sont la présure, les pepsines bovines, porcines et du poulet.

Ces protéases sont formées à partir d'un précurseur (zymogène), forme inactive, sécrétée par la muqueuse gastrique.

Les enzymes coagulants d'origine végétale sont extraits par macération de divers organes de plantes supérieures. Parmi les espèces connues, on peut citer ; le figuier, le gaillet, l'artichaut, le chardon. Ces extraits enzymatiques bruts sont très utilisés dans des fabrications de fromages fermiers au Portugal, en Espagne et au nord-africain (Algérie, Maroc, Tunisie) (**Silva et Malkata, 2005**).

D'autres extraits coagulants ont été obtenus à partir de plantes tropicales ; Les plus connus sont : la papaïne (extraite des feuilles de papayer), et la bromélaïne (extraite de l'ananas). Ces protéases, contrairement aux autres enzymes coagulants appartiennent au groupe de protéases sulphydryls (**Yamamoto, 1975 ; Rao et al, 1998**).

Les enzymes coagulants d'origine microbienne sont produits à partir des cultures de bactéries, moisissures et champignons. La protéase de *Bacillus cereus* dégradait rapidement la caséine entière. Du cheddar préparé par la protéase de *Bacillus subtilis* présente une faveur acceptable ; cependant, le rendement était très faible suite à une protéolyse excessive (**Ernstrom et Wongt, 1983 ; Ramet, 1997**).

### I.7 Effet des paramètres physico chimique sur la coagulation du lait

L'activité coagulante des enzymes coagulante le lait dépend essentiellement de plusieurs facteurs, à savoir :

#### ➤ Effet du potentiel d'hydrogène

Le potentiel d'hydrogène est un facteur important pour la coagulation du lait, car il garantit le processus de gélification, mais aussi contrôle la cinétique de formation du réseau et par conséquent la structuration du gel de caséine. Pour obtenir un coagulum de meilleure qualité, il faut que le lait ait son pH adéquat.

#### ➤ Effet de température

La coagulation enzymatique du lait est fortement dépendante de la température, une baisse de la température, par rapport à son optimum, provoque la solubilisation du phosphate de calcium micellaire, et alors le processus de coagulation se ralentit.

Après un chauffage, il y a une augmentation du temps de gélification par la chymosine accompagnée d'une diminution de la fermeté du gel formé. Le chauffage a un effet au niveau de la phase primaire (enzymatique) de la coagulation, tandis que son effet reste marqué au moment de la phase secondaire (phase d'agrégation des protéines) (Allogie et al, 2000 ; Najera et al, 2003 ; Anema et al, 2005).

#### ➤ Effet de la concentration en $\text{Ca}^{2+}$

L'addition de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) diminue le temps de coagulation par la présure et augmentent la proportion de caséine coagulable, déterminant ainsi une augmentation du rendement en fromage (Mcmahon, 1984b ; Moutilla , 1995; Balcones , 1996).

Cette addition de Chlorure de calcium au lait ou à une suspension micellaire entraîne un abaissement du niveau de protéolyse de la caséine  $\kappa$  nécessaire à l'agrégation (Famelart, 2004). L'agrégation des caséines est ainsi accélérée par l'addition de calcium et par conséquent une réduction du potentiel de réduction des micelles et la formation du gel. Le chlorure de calcium apporté augmente les forces ioniques et entraîne une diminution du pH, qui induit l'augmentation des

concentrations en calcium soluble et ionique (Moutilla et al, 1995; Balcones et al, 1996).

### ➤ La concentration en enzyme

Cette coagulation est le résultat d'une réaction d'hydrolyse enzymatique suivie d'une réaction d'agrégation des protéines (Van hooydonk et Walstra, 1987). Le temps de coagulation diminue avec l'augmentation de la concentration en enzyme (Mcmahon et al, 1984a ; Carson et al, 1987).

## I.8 Les succédanés de présure

Actuellement, les différents succédanés sont le plus souvent classés en fonction de leur origine :

- **Succédanés** d'origine animale :
- **Succédanés** d'origine végétale ;
- **Succédanés** d'origine microbienne (bactéries ou champignons).

### I.8.1 Les succédanés de présure d'origine animale

#### ➤ La pepsine

La pepsine est efficace pour rompre les liaisons peptidiques entre les acides aminés hydrophobes et aromatiques. Les plus utilisées sont :

- **La pepsine bovine**

La pepsine bovine est extraite à partir des caillottes de bovins adultes et de veaux sevrés. Les propriétés protéolytiques de la pepsine bovine sur les caséines sont plus semblables à celles de la chymosine (Ernstrom et Wong, 1983 ; Barbano et Rasmussen).

- **La pepsine porcique**

Elle est produite à partir de la muqueuse gastrique du porc sous sa forme inactive, formée d'une seule chaîne polypeptidique composée de 321 résidus d'acides aminés, et son poids moléculaire est de 35 000 Da. Son activité catalytique est la plus

élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat (**Bohak, 1969 ; Antonini et Ribadeau-Dumas, 1971**).

Le principal inconvénient de la pepsine porcique comme agent coagulant du lait est le fait que son activité coagulante est fortement dépendante du pH. Aux valeurs de pH voisin de 6,5 et de température voisine de 30 °C, conditions utilisées en fromagerie, la pepsine porcine est partiellement dénaturée. (**Andren Et Dekoning, 1982**)

- **La pepsine de volaille**

La pepsine de poulet diffère de la pepsine bovine et porcine par sa stabilité dans les solutions à pH neutre et modérément alcalin. Elle est stable aux alentours du pH de 8 à 8,5. L'inactivation à pH 6,5 à 7 est une caractéristique particulière aux pepsines de la plupart des vertébrés (**Bohak,1969**).

- **La chymosine**

La chymosine est sécrétée inactive sous forme de « pro-chymosine » dans la caillette. L'activité optimale de la chymosine est obtenue à pH 5,5 et à une température de 42 °C. En secteur fromager, la chymosine donne moins de protéolyse, et par suite moins de composés amers (**Bouyoucef,taouzin et al, 2016**).

- **La trypsine**

Cette protéase digère les protéines en peptides, pour libérer des fragments peptidiques d'acides aminés basiques. Elle rompt les chaînes peptidiques principalement du côté carboxylique des acides aminés lysines et arginine. C'une protéase digestive à serine, l'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du goût amer qu'elle entraîne (**Rao, Tanksale et al, 1998**)

### I.8.2 Les succédanés de présure d'origine végétale

Ces protéases sont extraites à partir de plante, telle que :

#### ➤ *Cynara cardunculus*

Originnaire de l'Europe méridionale, elle s'appelle parfois Cardonnette, Cardonnette, artichaut sauvage, car il appartient à la grande famille des chardons.

Cette plante est potagère vivace, avec un rhizome, généralement cultivée en annuelle, très appréciée pour ses côtes charnues et non pour ses feuilles épineuses. Ses grandes feuilles pennées, découpées en lobes profonds, épineuses, sont gris argenté, portées par un pétiole épais, large et charnu, avec une nervure centrale marquée.

La floraison n'intervient qu'en deuxième année entre juin et septembre. Les fleurs mauves bleutées sont regroupées en capitules semblables à celles des artichauts. L'enzyme (protéase végétale) de cette plante est localisé dans les fleurs. ( **Anonyme 2**)

#### ➤ *Le Galactites tomentosa*

La plante *Galactites tomentosa* appelée le chardon laiteux, chardon élégant. Sa hauteur, très variable de 20 à 80 cm. La tige très ramifiée en haut, tomenteuse, et très ramifiée et tomenteuse. Les feuilles sont longues, étroites, profondément dentées, presque ailées, épineuses, cotonneuses en dessous et vertes en dessus, mais chargées de taches laiteuses (**De monet et al, 1805**).

Les capitules des fleurs de *G. tomentosa* sont assez grands (3 cm de diamètre environ), avec un involucre formé de nombreuses bractées érigées, terminées par de longues épines, souvent entourées d'un voile arachnéen. Toutes les fleurs sont tubulées.

Les extérieures sont grandes et rayonnantes, de couleur pourprée ou violacée (il existe aussi des spécimens à fleurs presque blanches.), stériles, profondément découpées en cinq lanières rigides alors que les intérieurs sont plus petits.

L'enzyme (protéase végétale) de cette plante est localisée dans les fleurs.

### ➤ *Le Pélargonium graveolens*

C'est une plante facile de culture, aux fleurs de petite taille, mais jolies. Outre un parfum particulièrement agréable, elle était utilisée comme plante médicinale. Aujourd'hui, la science s'intéresse à nouveau aux molécules chimiques produites par la plante *Pelargonium graveolens*. (**Anonyme 1**)

De nombreux cultivars ont été sélectionnés et cultivés pour leur parfum dans plusieurs régions du globe. Elle est répartie dans la région du Cap de Bonne-Espérance et plus largement l'Afrique du Sud et dans l'Ouest de l'Afrique du Sud, les pluies se produisent l'hiver (**Anonyme 3**).

L'enzyme de cette plante est une protéase végétale localisée dans les tiges et fortement dans les feuilles.

## *Partie expérimentale*

# *Matériel et Méthodes*

## I. Matériel et méthodes

### I.1 Matériel végétal

Afin d'atteindre le but de cette étude, quatre succédanés de la présure, appartenant au règne animale et végétale, ont été sélectionnés.

Le choix des succédanés a été fait en tenant compte non seulement des données bibliographiques, mais aussi de la pratique ancestrale des habitants du bassin de la méditerranée.

Pour le choix des succédanés de la présure d'origine végétale, trois plantes ont été sélectionnés, à savoir ; le *Cynara cardunculus*, le *Galactite tomentosus* qui appartiennent à la famille des Astéracées et le *Pelargonium graveolens* de la famille des Géraniacées géranium roze.

La récolte a été faite en mois de mai 2021 à Adekar. Les fleurs sont la partie récupérée pour le *Cynara cardunculus* et le *Galactite tomentosus* tandis que pour le *Pelargonium graveolens* la partie récupérée sont les feuilles et les tiges. Le choix de ces parties, dépend de la localisation de l'enzyme recherché.



Figure 2 : Photographie des trois plantes utilisées pour extraire l'enzyme.

a : *Cynara cardunculus*    b : *Galactites tomentosus*    c : *Pelargonium graveolens*

Les feuilles, fleurs et tiges récoltées subissent un séchage à l'étuve à la température de 40 °C, au niveau de laboratoire de nutrition du bloc 9 de l'université de Béjaïa, jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Une fois séchées, les feuilles, fleurs et tiges subissent un broyage à l'aide d'un broyeur électrique plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une poudre.

Les particules ainsi obtenues sont tamisées en utilisant des tamis de diamètre de 250 µm pour l'obtention d'une poudre homogène.

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

Pour le choix des succédanés de la présure d'origine animale, les pro-ventricules de la caille Montagnier (**Figure N° 3**) ont été sélectionnés.



**Figure N° 3 :** Photographie de la caille Montagnier étudié et son appareil digestif.

Les pro-ventricules ont été prélevés, à partir de cailles, âgée entre 30 et 40 jours. Après abattage, plumage et éviscération, les pro-ventricules sont séparés du tube digestif (**Figure N° 3**), par incision au niveau de la partie supérieure reliée au jabot et au niveau du col inférieur relié au gésier. Les pro-ventricules sont ouverts par incision longitudinale et rincés à l'eau courante pour éliminer les particules d'aliments adhérentes. Une fois bien égouttées, elles sont réparties, dans du papier aluminium et

transportées au laboratoire dans une glacière, pour les conserver au congélateur à une température de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'étape de l'extraction.

## **I.2 Extraction et préparation des extraits enzymatiques**

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

L'extraction du système enzymatique à partir des poudres est réalisée selon la méthode décrite par **Sousa et Malacata (2002)** et **Lamas et al, (2001)**.

Une prise d'essai de la poudre (1 g) est solubilisée dans un volume de 7 mL de tampon phosphate (0.05 M, pH=5.5) et l'ensemble est laissé au réfrigérateur pendant toute une nuit. La solution ainsi obtenue, est filtrée sur du papier filtre, et le filtrat récupéré est centrifugée à 15 000 g pendant 20 min à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant récupéré, qui représente l'extrait enzymatique brut, est réparti dans des Eppendorfs de 2 mL, et gardé au congélateur.

### **I.2.2 Procèdes d'extraction de l'enzyme animal**

L'extraction de l'extrait enzymatique des pro-ventricules de la caille Montagnier est effectuée selon le protocole décrit par **Bohak (1970)**.

Les pro-ventricules, conservés à froid, sont broyés pour être macérés dans une solution contenant du chlorure de sodium (NaCl) et du bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ).

Le macérât récupérer est ensuite filtré et activé avec une solution à pH 2, pendant une demi-heure. Après activation, un ajustement du pH à la valeur finale de 6,6 est effectué, et l'extrait enzymatique est alors réparti dans des Eppendorf qui seront gardés au congélateur.

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

Pour la caractérisation des extraits enzymatiques récupérés, diverses analyses ont été menées, à savoir ; la teneur en eau et le taux en matières sèches, le pH et la teneur en protéines.

### I.3.1 Humidité et le taux de matières sèches

Le taux d'humidité et de matières sèches des extraits enzymatiques bruts étudiés ont été déterminé selon la méthode décrite par **Bouacherine et Ouchene (2017)**.

Un échantillon de 1 ml de l'extrait enzymatique est placé dans une capsule en porcelaine préalablement tarée. Il est ensuite mis à l'étuve à  $103 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'obtention d'une masse constante puis, il est refroidi dans un dessiccateur. Le pourcentage en matières sèches est déterminé par la relation suivante :

$$MS (\%) = P \times 100 / P_i$$

$P_i$  : Poids initial en gramme, de la prise d'essai ;

$P$  : Poids en gramme, de la prise d'essai séchée après passage dans l'étuve à  $103 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

À partir du taux de matières sèches, le taux d'humidité ( $H \%$ ) a été déterminé selon la formule suivante

$$H (\%) = 100 - MS (\%)$$

### I.3.2 Mesure du potentiel hydrogène

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

### I.3.3 Dosage du taux de protéines dans les extraits enzymatiques bruts

Le dosage des protéines totales dans les extraits enzymatiques est déterminé selon la méthode de **Bradford (1976)**.

La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique dont le principe repose sur l'adsorption du bleu de Coomassie G-250 sur les protéines (avec les acides aminés basiques tels que : Arg, Lys, His). Une fois liée aux protéines, sa couleur vire vers le bleu avec une absorbance maximale aux alentours de 595 nm, dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon.

Pour 500  $\mu$ L de chaque extrait enzymatique, 2 mL de réactif de Bradford sont ajoutés. Une fois bien homogénéisé avec un vortex, l'ensemble est gardé à l'obscurité et à température ambiante pendant 20 minutes. L'absorbance finalement mesurée au spectrophotomètre à 595 nm.

La concentration en protéines, des extraits enzymatiques, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage avec la protéine du sérum albumine bovine (SAB) réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons (**Annexe II**).

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

L'activité enzymatique des extraits bruts, est estimée par deux méthodes, à savoir la mesure de l'activité protéolytique et l'évaluation de l'activité coagulante.

##### **I.4.1 Détermination de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique est déterminée selon la méthode décrite par **Green et Stackpoole (1975)**. Cette mesure permet d'évaluer le taux de dégradation du substrat (caséine) par l'enzyme pendant la phase primaire (phase enzymatique). Pour cela, nous avons mesuré la concentration de produits d'hydrolyse de la caséine, solubles dans l'acide trichloracétique (TCA) à 12 % concentration finale.

En effet, l'activité protéolytique de nos extraits enzymatiques est déterminée en employant la caséine comme substrat. Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par une protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés. L'activité protéolytique est mise en évidence par un dosage colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de **Lowry. (1951)**.

L'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard.

Une unité de protéase (U) correspond à l'équivalent de 1  $\mu$ g de tyrosine libérée en une heure de digestion par 1 ml d'extrait enzymatique, avec comme substrat, soit la caséine, soit l'hémoglobine (**Mechakra, 1999**).

Le mélange réactionnel consiste à mélanger 1 g de caséine dans 50 mL de tampon phosphate (0.1 M, pH 7). Un volume de 1 ml de ce mélange est additionné de 1 mL d'extrait enzymatique, qui sera ensuite bien agité et incubé au bain-marie à la température de 35 °C pendant 20 minutes, et la réaction est arrêtée par l'addition de 5 mL de TCA à 5 % puis laissée au repos pendant 15 minutes à température ambiante.

L'ensemble est alors centrifugé, et 0.5 mL de surnageant est additionné de 2,5 mL de la solution C préparée en mélangeant un volume de 100 mL de la solution A avec un volume de 2 mL de la solution B.

La solution A est préparée en mélangeant 1 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 5 g de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) dans 250 mL d'eau distillée.

La solution B est préparée en mélangeant 0.1 g de tartrate sodium-potassium (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>) et 0.032 g de sulfate de cuivre CuSO<sub>4</sub> dans 10 mL d'eau distillée.

Après une incubation pendant 10 minutes à 35 °C, un volume de 250 µL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au 1/2) est ajouté. Une fois le mélange bien agité et incubé à température de 35 °C pendant 20 min, une coloration bleue apparaît, et l'absorbance est alors mesurée à 660 nm.

La concentration en tyrosine des extraits, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la tyrosine dans les mêmes conditions expérimentales (annexeIII).

L'activité protéolytique, exprimée en µg/h.ml, correspond à la libération de 1 µg de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans 1 mL de substrat.

À partir de l'activité protéolytique, une activité spécifique, exprimée en U/mg, est calculée. Elle est définie comme étant le rapport entre l'activité enzymatique et la teneur en protéines de l'extrait enzymatique.

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

#### I.4.2 Evaluation de l'activité coagulante

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

La technique consiste à ajouter à 100 ml de CaCl<sub>2</sub> (0.01M) ,12 mg de lait écrémé avec ajustement du pH à 6,5. à 1 ml de l'extrait enzymatique. Le temps de coagulation est mesuré à 30 °C ; et correspond au temps nécessaire à l'apparition des premiers flocons dans un mince film de lait s'écoulant sur la paroi du tube incliné.

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

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

Avec :

**UP** = unité présure ;

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

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

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

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

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

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

La force coagulante (F) est calculée selon la formule suivante :

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

Avec :

**V**: volume de lait ;

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

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

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

## **I.5 Étude des paramètres influençant l'activité enzymatique**

### **I.5.1 Effet de la température sur l'activité coagulante**

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

Les températures du lait utilisées sont : 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C pour l'extrait enzymatique brut des échantillons.

### **I.5.2 Effet du potentiel hydrogène sur l'activité coagulante**

Afin d'étudier l'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique des échantillons étudiés, le pH du lait (substrat de Berridge) est ajusté aux valeurs de : 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 ; 8 pour l'extrait enzymatique brut des échantillons étudiés, par l'addition des solutions de HCl (0,1 N) ou de NaOH (0,1 N).

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

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

**I.5.3 Effet de la concentration en chlorure de calcium sur l'activité coagulante**

L'addition du chlorure de calcium au lait, pratique courante en fromagerie, a pour effet de réduire le temps de coagulation et accroître la fermeté du coagulum (ECK, 1997).

L'influence de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  du lait sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques est étudiée à 35 °C et à pH=6.5, en utilisant le substrat de Berridge comme substrat de la réaction enzymatique, préparé avec différentes concentrations en  $\text{CaCl}_2$ , 60 °C.

**I.5.4 Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique**

L'influence de la concentration de l'enzyme sur l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique des échantillons, est déterminée selon le protocole de **Green et Stackpoole (1975)**, en variant la concentration du volume enzymatique de 10 à 60mg/ml.

## *Résultats et discussion*

## I. Caractérisation physico-chimique des pepsines végétales et animale

Après l'opération d'extraction effectuée, trois extraits d'origines végétales et un extrait d'origine animale ont été récupéré. Les extraits enzymatiques végétaux sont nommés : E1 : extrait enzymatique de *Cynara cardunculus*, E2: extrait enzymatique de *Galactites tomentosa*, E3 : extrait enzymatique de *Pélargonium graveolens*.

L'extrait enzymatique animal est nommé E4 : extrait enzymatique de proventricules de caille Montagnier.

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

**Tableau II** : Caractéristiques physicochimiques des extraits enzymatiques étudiés.

	Origine végétale			Origine animale
	<i>E<sub>1</sub></i>	<i>E<sub>2</sub></i>	<i>E<sub>3</sub></i>	<i>E<sub>4</sub></i>
<b>Protéine (mg/mL)</b>	41,5±0,62	52,2±0,07	67,3±2,63	208,2±0,19
<b>Activité protéolytique (µg/mL.h)</b>	88,1±0,63	98,7±0,37	179,8±0,61	112±0,04
<b>Activité protéolytique spécifique (µg/mL.h/mg)</b>	2,12	1,75	2,66	0,54
<b>Activité coagulante (UP/mL)</b>	9,8±0,17	11,4±0,31	17,5±0,22	14,6±0,05
<b>Force coagulante(F)</b>	133,3±0,19	160±0,37	400±0,19	266±0,12
<b>Couleur</b>	Gris noir	brune claire	verdâtre	Blanc brun
<b>Texture</b>	Limpide	limpide	visqueux	visqueux
<b>Ph</b>	7,22±0,03	5,13±0,01	6,2±0,01	3,44±0,03
<b>Matière Sèche (%)</b>	23,05±0,03	19,2±0,7	27,11±0,04	16,22±0,4

Les résultats de la présente étude montrent que le *Pélargonium graveolens* possède le taux le plus élevé de matière sèche qui correspond à 27,11 ±0,04 %, suivi respectivement des extraits de *Cynara cardunculus* (23,05 ±0,03 %) et de *Galactites tomentosa* (19,2 ±0,7 %), tandis que l'extrait enzymatique

des pro-ventricules de la caille est le plus pauvre en matière sèche avec une valeur de  $16,22 \pm 0,4$  %. Les extraits d'origine végétale ont plus de matière sèche que l'extrait d'origine animale.

Les résultats obtenus montrent que le potentiel d'hydrogène des extraits enzymatiques varie de  $3,44 \pm 0,03$  à  $7,22 \pm 0,03$ . Le pH de l'extrait enzymatique de *Cynara cardunculus* est de  $7,22 \pm 0,03$ , légèrement supérieur à celui de *Pélagonium graveolens* ( $6,2 \pm 0,01$ ) et de *Galactite tomentosa* ( $5,13 \pm 0,01$ ). Le pH le plus acide est retrouvé dans l'extrait des pro-ventricules de la caille avec une valeur de  $3,44 \pm 0,03$ .

Le pH influence directement l'activité coagulante des extraits (**Nouani et al., 2009**).

D'après les résultats obtenus, la teneur en protéine des extraits enzymatiques varie de  $41,52 \pm 0,62$  à  $208,22 \pm 0,19$ . La teneur en protéine la plus élevée est retrouvée dans l'extrait enzymatique (pepsine) de la caille, tandis que le taux le plus faible est celui de l'extrait enzymatique de *Cynara cardunculus*. Ces résultats ont montré également que les extraits d'origine végétale possèdent moins de protéines par rapport à l'extrait enzymatique d'origine animale.

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

Les résultats obtenus de l'estimation de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques étudiés indiquent que l'activité protéolytique de l'extrait animal (pepsine de la caille) est de  $112 \pm 0,04$ , plus élevé que celle des extraits enzymatiques d'origine végétale, dont l'extrait de *Pélagonium graveolens* est le plus élevé ( $179,81 \pm 0,61$ ) suivi de l'extrait de *Galactites tomentosa* ( $98,74 \pm 0,37$ ) et de *Cynara cadunculus* ( $88,14 \pm 0,63$ ), respectivement.

Les résultats des travaux de recherches des auteurs comme **Bohak (1969)** ont confirmé que l'activité protéolytique exprimée sous ses différentes formes pour la pepsine de poulet est plus élevée que celle de la présure. Ceci semble valable que la pepsine soit testée principalement lors de l'affinage de certains fromages (Cheddar, Domiati, Edam, Emmental et Kachkaval) spécifié par l'amertume accentuée et

caractérisé par la libération du tryptophane et/ou de la tyrosine (**Gordin et Rosenthal, 1978, Gordin et al., 1978, Gordin et Kosikowski, 1979, Stainley et al., 1980, Findlay et al., 1984, Green et al., 1984, Wahba et El-abbass, 1984**).

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

Les résultats de la présente étude ont montré que les extraits étudiés possèdent tout une activité coagulante remarquable, et ceci par la capacité des protéases de *Cynara cardunculus*, *Galactite tomentosa* et de *Pélargonium graveolens* ainsi des pro-ventricules de caille Montagnier a coaguler le lait.

L'extrait brut de *Pélargonium graveolens* présente l'activité coagulante la plus élevée de l'ordre de  $17,53 \pm 0,22$  UP/mL. Ce résultat est supérieur à celui obtenu avec l'extrait brut des pro-ventricules de caille ( $14,66 \pm 0,05$ ). Il est également supérieur au résultat de l'extrait brut de *Galactite tomentosa* ( $11,42 \pm 0,31$ ) et les résultats des ce dernier sont aussi supérieur a ceux de *Cynara cardunculus*, ( $9,82 \pm 0,17$ ).

L'activité coagulante de l'extrait brut de *Galactite tomentosa* ( $11,42 \pm 0,31$ ) est inférieur au resultat obtenu par **Benkahoul, (2016)** ou l'activite de l'extrait brut des pétales de *G. tomentosa* ( $16.10^{-4}$ ), anssi l'activite coagulant de *Cynara cardunculus*, ( $9,82 \pm 0,17$ ) est aussi inferieur au résultat obtenu par (**Reguieg et Jidel, 2018**) qui est 14.28 unités pour l'extrait de fleurs de *Cynara cardunculus*.

Pour l'activité coagulant de la caille Montagnier on la compare a celle des proventricule de poulet dont L'extrait brut obtenu renferme une activité de 15,08 U.A.C./ml une valeur légèrement supérieur a celle de l'extrait brut des proventricules de caille ( $14,66 \pm 0,05$ ).

Les résultats de la présente étude montrent que les quatre extraits ont des activités coagulantes différentes.

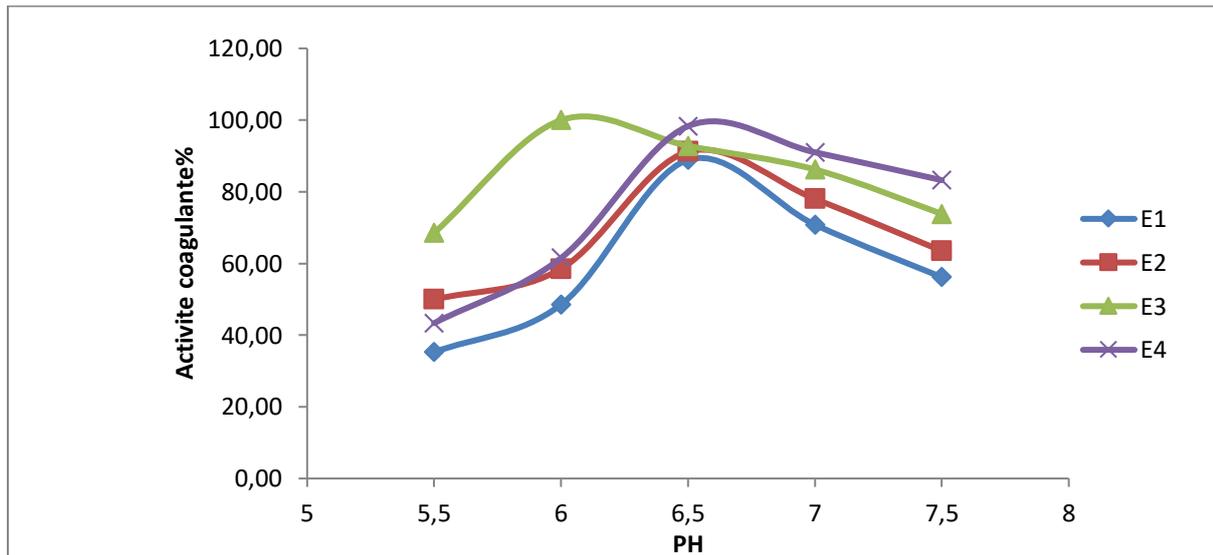
Cette différence peut être attribuée à plusieurs facteurs, tels que le caractère variétal, lie au sol les conduites agronomique et le climat, ainsi que le taux d'ensoleillement (**Durand et Chantraine 1982**) .

La différence de l'activité coagulante peut être aussi liée au pH d'emprésurage qui influe directement l'activité coagulante des enzymes, Le temps de floculation diminue davantage lorsque le pH est abaissé au-dessous de sa valeur normale dans le lait. Toutes les enzymes coagulantes de fromagerie sont des protéases à caractère acide. De ce fait, leur activité est généralement optimale aux valeurs proches de 5,5 (Ramet, 1997).

### I.1 Détermination des conditions optimales de coagulation des extraits enzymatiques étudiés

#### ➤ Effet du pH sur l'activité coagulante des l'extraits brutes étudiés

L'effet du pH sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique de *Pélagonium graveolens* a été étudié en ajustant le pH du lait aux valeurs situés dans l'intervalle de 5,5 à 7,5. La température d'incubation est fixée à 37 °C. Le pH optimum de coagulation du lait est déterminé en observant le temps de floculation le plus court. L'activité coagulante de l'extrait brut des quatre extraits en fonction du pH du lait est illustrée sur la **Figure N°4**.



**Figure N°4** : Représentation graphique de l'influence du pH sur l'activité coagulante des extraits enzymatiques étudiés.

Les résultats illustrés par la figure ci-dessus indiquent une augmentation de l'activité coagulante des l'extraits enzymatiques au fur et à mesure que le pH du lait augmente. En effet :

Pour l'extrait de *Cynara cardunculus* l'activité passe de 35,22 UP a PH 5,5 et atteins son optimum aux valeurs proches de PH 7 a 70,81% suivie par une perte importante de l'activité de coagulation du lait aux valeurs proches de pH 7,5.

Pour extrait enzymatique de *Galactites tomentosa* et *Cynara cardunculus* l'activité passe de 49,94 UP a PH 5,5 et atteins son optimum aux valeurs proche de PH 6,5 a 91,2% suivie par une perte importante de l'activité de coagulation du lait aux valeurs proche de pH 7,5.

Pour l'extrait de *Pélargonium graveolens* l'activité passe de 68,51 U.P à pH 5,5 et atteint son optimum aux valeurs de pH proches de 6,0 à 100% U.P. suivie par une perte importante de l'activité de coagulation du lait aux valeurs proche de pH 7,5.

Pour extrait enzymatique de pro-ventricules de caille Montagnier l'activité passe de 43,34 U.P à pH 5,5 et atteint son optimale aux valeurs de pH proches de 6,5 à 98,3% U.P. suivie par une perte importante de l'activité de coagulation du lait aux valeurs proche de pH 7,5.

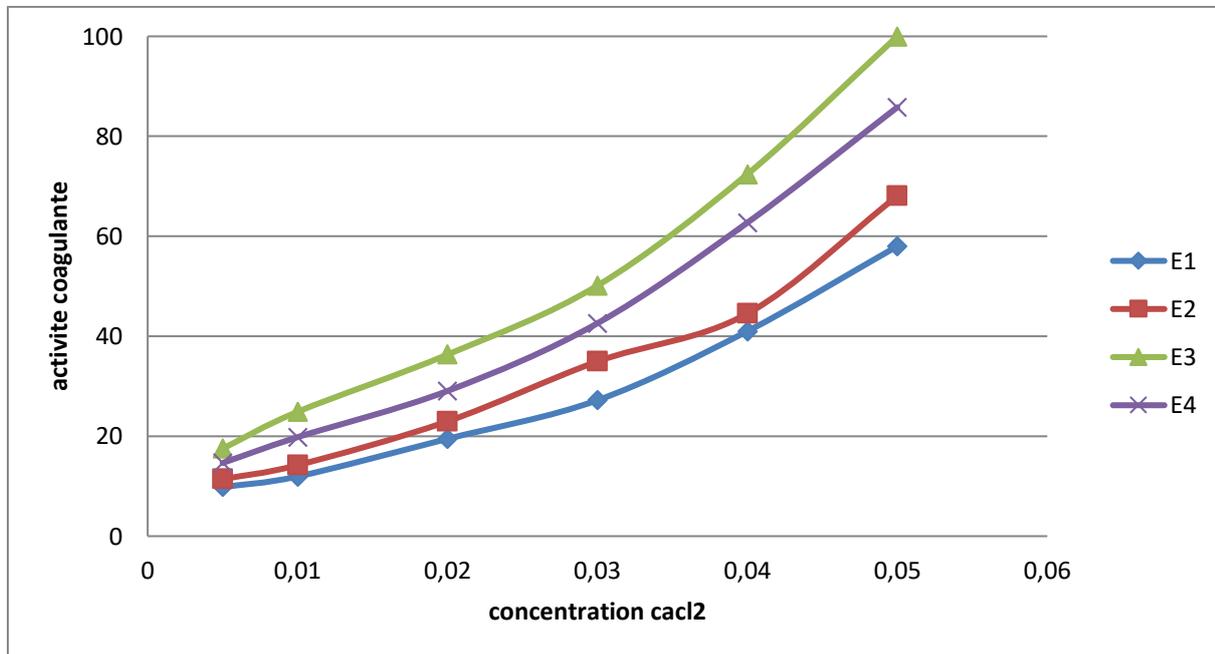
L'influence de l'acidification sur le temps de floculation résulte pour une part d'un effet sur l'activité de l'enzyme, et d'autre part sur la réaction d'agrégation par suite de la diminution de la stabilité des micelles, liées à la neutralisation des charges négatives, et la libération d'ion calcium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

#### ➤ **Effet de la concentration de chlorure de calcium sur l'activité des l'extraits brutes étudiés**

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

L'effet de la concentration du  $\text{CaCl}_2$  du lait sur l'activité coagulante de l'extrait brut de la pepsine végétale a été étudié en variant la concentration du  $\text{CaCl}_2$  du lait (substrat de Berridge) aux valeurs de 0,005 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 et 0,05 M

Les résultats obtenus, de l'effet de la concentration de  $\text{CaCl}_2$ , sur l'activité coagulante des extraits végétaux bruts est représenté dans la **Figure N°5**



**Figure N°5** : Représentation graphique de l'influence de la concentration du  $\text{CaCl}_2$  sur l'activité coagulante des l'extraits enzymatiques étudiés.

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

Pour l'extrait de *Cynara cardunculus* l'activité passe de 9,82% UP a la concentration 0,005 et atteint son optimal aux valeurs proche 0,05 a 58,02%

Pour l'extrait enzymatique de *Galactites tomentosa cardunculus* l'activité passe de 11,42% a concentration 0,005 et atteins son optimale aux valeurs proche 0,05 a 68,07 %

Pour l'extrait de *Pélargonium graveolens* l'activité passe de 17,53% concentration 0,005 et atteint son optimale aux valeurs proche 0,05 à 100%

Pour extrait enzymatique de pro-ventricules de caille Montagnier l'activité 14,66 % concentration 0,005 et atteint son optimale aux valeurs proche 0,05 à 85,82%

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

Selon (**Daviau et al, 2000**), le calcium a des effets opposés en fonction de sa concentration Ph. Le calcium apporté sous forme de CaCl<sub>2</sub> entraîne une augmentation de la force ionique, une diminution de pH et une élévation du produit de solubilité apparent du phosphate de calcium. Il en résulte alors une augmentation des concentrations en calcium soluble et ionique.

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

Ce résultat confirme que l'effet du calcium sur le taux de raffermissement du gel est fortement dépendant du pH car le couple pH et concentration du lait en chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) est la seule combinaison qui affecte la fermeté du coagulum et la vitesse de formation du gel (**Nájera, 2003; Mietton, 2004**)

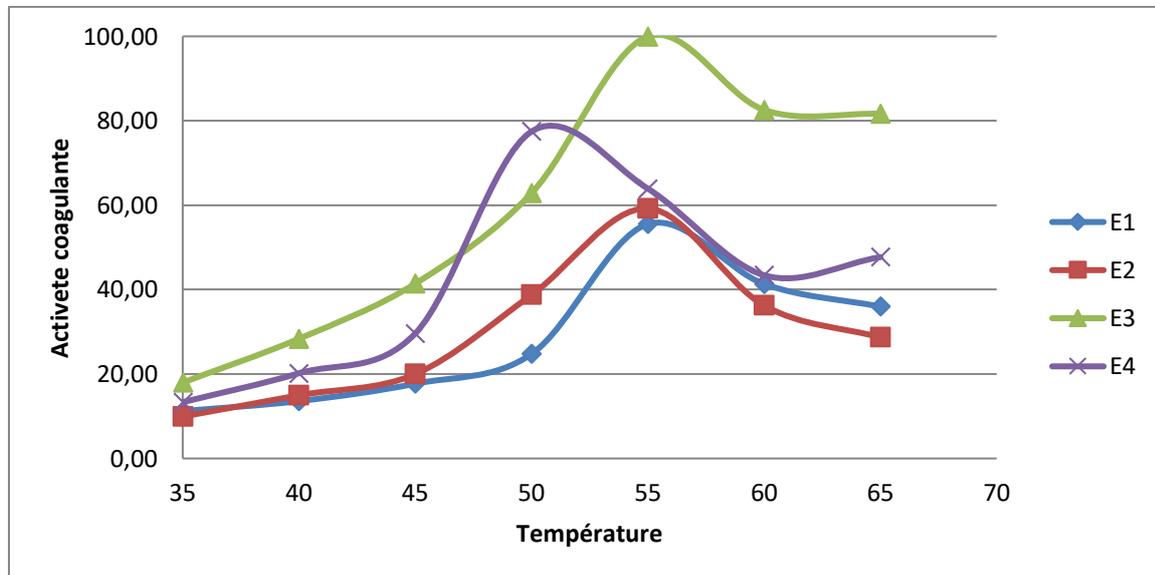
### ➤ **Effet de la température sur l'activité des extraits brutes étudiés**

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

Lorsque la température du milieu augmente, les particules (molécules ou ions) sont plus agitées, ce qui favorise la rencontre des différents réactifs. Les molécules s'entrechoquent et libèrent de l'énergie, qui permet ensuite d'atteindre plus rapidement le palier de l'énergie d'activation nécessaire à la réaction. Dans ce cas, l'augmentation de la température a un effet positif sur la réaction, mais après une certaine activité

thermique, elle diminue en raison de la dénaturation (Bayraktar et Önal, 2013; Kumar et al, 2012; Özer et al, 2010).

Les résultats obtenus, de l'influence de la température sur l'activité coagulante des extraits sont représentés dans la **Figure N°6**.



**Figure N°6:** Représentation graphique de l'influence de la température sur l'activité coagulante des l'extraits enzymatiques étudiés.

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

Pour l'extrait de *Cynara cardunculus* l'activité passe de 11,22% UP à température de 35C° et atteint son optimum aux valeurs proches 55,52% à 55 C° et décroît a 60 C°

Pour extrait enzymatique de *Galactites tomentosa* l'activité passe de 9,94 % a 35 C° atteint son optimum aux valeurs proches de 59,22 % à 55 C° et décroît a 60 C°

Pour l'extrait de *Pélargonium graveolens* l'activité passe de 17,98 % a 35 C° et atteint son optimum aux valeurs proche de 100% à 55 C° et décroît a 60C°

Pour extrait enzymatique de pro-ventricules de caille Montagnier l'activité passe de 13,34 % à 35 C° et atteint son optimum aux valeurs proche de 63,93 % et décroît à 60 C°

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

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

## *Conclusion et perspectives*

## Conclusion et perspectives

---

Le travail est entrepris afin d'étudier la possibilité de substituer la présure (d'origine animale) par des extraits bruts d'origine végétale et animale. L'étude est réalisée dans le but de contribuer aux travaux de recherche préexistants dans le domaine de l'industrie fromagère, et de renforcer l'idée de pouvoir trouver de nouvelles sources potentielles de succédanés de présure par des protéases extraites des pro-ventricules de la caille Montagnier, et également de différentes espèces végétales endémiques des sols largement répandues en Algérie, à savoir : le *Cynara cadunculus*, le *Galactite tamentosus* et le *Pélargonium graveolens*.

Pour atteindre l'objectif de l'étude, notre démarche a comporté deux étapes : en premier lieu, la récupération des matières premières renfermant le système enzymatique recherché, l'extraction de l'extrait brut et sa caractérisation physico-chimique et ceci en déterminant sa teneur en protéines, ainsi que les activités coagulantes et protéolytiques.

En seconde lieu, l'étude de l'influence des paramètres physico-chimique du lait à savoir ; la température, le pH, la concentration en  $\text{CaCl}_2$  et la concentration en extrait enzymatique sur ses activités coagulante et protéolytique a été réalisé.

Les diagrammes d'extraction appliqués et l'étude physico chimiques ont permis d'avoir des extraits enzymatiques dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Une activité protéolytique, exprimée en  $\mu\text{g/mL.h}$ , de l'ordre de  $88,14 \pm 0,63$  pour le *Cynara cadunculus*, de  $98,74 \pm 0,3763$  pour le *Galactite tamentosus*,  $179,81 \pm 0,61$  pour le *Pélargonium graveolens*.
- L'extrait peptique des pro-ventricules de la caille Montagnier possède l'activité protéolytique la plus élevée de l'ordre de  $112 \pm 0,04 \mu\text{g/mL.h}$ .
- Une activité coagulante, exprimée en UP/mL, qui oscille de  $9,82 \pm 0,17$  pour l'extrait brut de *Cynara cadunculus* à  $17,53 \pm 0,22$  pour l'extrait brut de *Pélargonium graveolens*. L'extrait enzymatique des pro-ventricules de la caille Montagnier possède une activité coagulante de l'ordre de  $14,66 \pm 0,05 \text{ UP/ml}$ .

Les résultats de l'étude de l'influence des paramètres physico-chimique du lait (la température, le pH, la concentration en  $\text{CaCl}_2$ ) et la concentration en extrait

## Conclusion et perspectives

---

enzymatique sur ses activités coagulante et protéolytique ont révélé des résultats intéressants et promoteurs.

L'apport de cette étude est non négligeable, et les résultats obtenus mettent en évidence la possibilité d'obtention des extraits bruts coagulant le lait qui peuvent remplacer la présure, à partir des matières premières végétale et animale non exploitée assez disponibles en Algérie. Ainsi, et pour des impératifs économiques et technologiques, l'extrait des espèces végétale et animale déjà cite doit être pris en considération.

Cependant, afin de compléter cette étude, il serait souhaitable d'approfondir ce travail par :

- L'étude des différents facteurs influençant l'extraction des protéases végétales et de la pepsine animale afin d'optimiser les conditions d'extraction ;
- L'étude d'utilisation des extraits enzymatique (les protéases végétales et la pepsine) dans la fabrication fromage : elle doit permettre la mise en évidence de l'effet des enzymes sur la qualité du fromage depuis l'étape de coagulation jusqu'à l'affinage ;
- L'application de méthodes plus performante pour la purification des protéases végétales et de la pepsine animale afin d'envisager d'autres applications.

## *Références bibliographiques*

## Les références bibliographiques

---

**Aliais C., (1984).** Sciences du lait : principes des techniques laitiers, 4ème édition  
Paris : Edition SEPAIC , 814p.

**Alais C., (1974).** Science du lait, principes de la technologie laitière. 3eme édition.  
Compte de la société d'édition et de la publication agricole industriel et commerciale  
42. Paris

**Alloggi V., Caponio F., Pasqualone A., Gomes Tommaso., (2000).** Effect of heat  
reatment on the rennet clotting time of goat and cow milk. *Food Chemistry*, 70: 5155.

**Androuët. P., (2002).** Le dictionnaire des fromages du monde. (Amazon, Ed.) (Le  
Cherche Midi). Collection Beaux Livres.

**Antonini, J., Et Ribadeau Dumas., B., (1971).** Isolement, purification et propriétése  
deux zymogènes gastriques bovins, propriétés des protéases correspondants.  
*Biochimie*, 53:321-. 329

**Anema Sg., Lee Sk., Klostermeyer H.,(2005).** Effect of pH at heat treatment on the  
hydrolysis of  $\kappa$ -casein and the gelation of skim milk by chymosin. *LWT Food Science  
and Technology*, 40: 99-106.

**Balcones E., Olano A., Calvo Mm.,(1996).** Factors affecting the rennet clotting  
properties of ewe's milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44: 1993-1996

**Bayraktar H and Önal S.,(2013).** Concentration and purification of  $\alpha$ -galactosidase  
from watermelon (*Citrullus vulgaris*) by three phase partitioning. Separation and  
purification technology 118:835-841.

**Barbano D., And Rasmussen M., R. R., (1992).** Cheese yield pefromance of  
Fermentation-produced chymosin and other milk coagulants *J.dairy Sci.* 75:1-12.1992.

**Benkahoul Malika.,(2016).**Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité  
coagulante des protéases de deux chardons endémiques, *Galactite tomentosa* et  
*Onopordumacanthium*.these Université des Frères MentouriConstantine,p. 56-58

**Berridge N.J., (1955).** 85 **Purification And Assay Of Rennin.** Methods in  
enzymologie volume 2 pp 69-77 Ed., Perlmann G.E. and LorandL ,Acad.Press Inc.,  
New York

**Boivert C., (1980).** Contribution à l'étude de la contamination du lait : mise en  
évidence de virus dans le lait cru par microscope électronique. Thèse : Med. Vét.,  
Toulouse, 66

## Les références bibliographiques

---

- Bohak, Z., (1969).**, Purification and characterisation of chicken pepsinogen and chicken pepsin J. biological chemistry. Vol. 244, N°.17: p.4638-4648
- Bohak Z., (1970).** Chicken pepsinogen and chicken pepsin, In : Methods in enzymology vol XIX protéolytic enzymes pp. 347-358, (Eds G.E. Perlmann and L.Lorand) ; Academic press, New York, 1042 p.
- Bourgeois C., Larpent J. P., (1981).** Microbiologie alimentaire : les Fermentations alimentaires. Paris : APRIA, Ed. Lavoisier. Tec et Doc, 334p.
- Bouacherine, M. And Z. Ouchene., (2017).** Valorisation d'un savoir faire Kabyle pour son application industrielle: Caractérisation d'un fromage à pâte molle fabriqué à partir du lait de vache coagulé avec l'enzyme du Ficus carica L, Université de Bouira.
- Bouyoucef, Y., A. Taouzinet, et al. (2016).** "Obtention et caractérisation d'une protease coagulante de Penicillium sp."
- Bradford M., (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry*72(1-2): 248-254.
- Brulé G, Lenoir J, Reneuf F. 1997.** La micelle de caséine et la coagulation du lait. In *le Fromage*. TEC & DOC Lavoisier: Paris; 7-41.
- Carson A., Hill C., Olson Nf.,(1987).** Kinetics of milk coagulation: III mathematical modelling of the kinetics of curd formation following enzymatic hydrolysis of kappa casein-parameter estimation. *Biotechnology and Bioengineering*, **29**: 601-611
- Cheftel J., Cheftel H And Besancon P., (1977).** Introduction a la biochimie et a la technologie des aliments.
- Creamer L.K., (2002).**Casein nomenclature, structure and association properties In: Encyclopedia of Dairy Science, Ed., H. Royinski, J. Fuquay, and P. Fox, Elsevier science Ltd, p.1895-1902
- Daviau C., Famelart M-H., Pierre A., Goudédranche H AndMaubois J-L., (2000).** Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Le lait* 80:397-415.
- Desmazeaud M., (1997).** Les enzymes utilisées en industrie laitières PP582-602 in *Laits et produits laitier scoord*. Luquet F.M. Tech et Doc Lavoisier.

## Les références bibliographiques

---

- De Monet B., J., De Lamarck, P., & De Candolle A., (1805).***Flore Française. 3eme, édition.* (Delmarck&Decadolle, Eds.). Paris.
- Durand, J.-R. And J.-M. Chantraine (1982).** "L'environnement climatique des lagunes ivoiriennes." *Revue d'Hydrobiologie Tropicale* **15**(2): 85-113.
- Eck A., (1975).** Le lait et l'industrie laitière. Imprimerie des presses universitaires de France
- Ernstrom C.A., And Wongt N.P., (1983).** Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In: Fundamentals on dairy chemistry. Ed., B.H. Webb, A.H. Johnson and J.A. Alford .2 ème ed., the Avipublishing Company Inc, p. 662-771, 929p
- Famelart Mh., (2004).** Environnement minéral et propriétés de gélification des caséines. In *Minéraux et Produits Laitiers*. TEC & DOC Lavoisier: Paris; 585-613.
- Findlay C.J., Stainley D.W., And Emmons D.B., (1984).** Chicken pepsin as a rennet substitute. *Food Science and Technology Journal*, 17 (2), 97-101.
- Fredot E., (2005).** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier:10-14 (397 pages).
- Flüeler O., And Puhanz . , (1978).** Neue Erkenntnisse über die Labträchtigkeit der Milch. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung* 7:61-68.
- Gastaldi E., Pellegrini O., Lagaude A., And De La Fuente Bt., (1994).** Functions of added calcium in acid milk coagulation. *Journal of food science* 59:310-312.
- Green M., L. And Stackpoole A., (1975).** "The preparation and assessment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase–swine pepsin mixture for Cheddar cheese making." *Journal of Dairy Research* **42**(2): 297-312.
- Green M.L., Valler M. J. And Kay J., (1984).** Assessment of the suitability for cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin preparations. *Journal of Dairy Research*, 51: 331-340.
- Gordin S., And Rosenthal I., (1978).** Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme. *Journal of Food Protection* ; Vol. 41, N° 9 ; 684-688.
- Gordin S., And Kosikowski F.V., (1979).** Chicken pepsin as a coagulant in cheddar cheesemaking. *Journal of Dairy Science*, 62 (suppl. 1) : 56-57.

## Les références bibliographiques

---

- Gordin S., Rosenthal I., Bernstein S., Navrot C., Balaban N., And Frank M., (1978).** Chicken pepsin as a substitute for calf rennetin cheese production. XX International Dairy Congress, E) : 441-442.
- Kumar VV, Sathyaselvabala V, Premkumar M, Vidyadevi T AndSivanesan S., (2012).** Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74:63-72.
- Hallen E., Lunden A., Allmere T., Andren A.,(2010).** Casein retention in curd and loss of casein into whey at chymosin-induced coagulation of milk. *Journal of Dairy Research*, 77(1): 71-76.
- Holt C.,(1997).** **The Milk Salts And Their Interaction With Caseins.** *In Advanced in Dairy Chemistry: Lactose, Water, Salts and Vitamins* (Vol. 3). Chapman & Hall: London; 233-256.
- Horne D and Banks J., (2004).** Rennet-induced coagulation of milk. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* 1:47-70.
- Green Ml., And Stackpoole A., (1975).** The preparation and assessment of a suitable *Mucor pusillus* Lindt proteinase–swine pepsin mixture for Cheddar cheese-making. *Journal of DairyResearch*42:297-312.
- Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P., Brule G(2008).** Les produits laitiers - 2ème édition. TEC&DOC. Paris: EMD S.A.S.176p.
- Jeantet R., Croguennec T., Garric G And Brule G., (2017).** Initiation à la technologie laitière, Editions Tec & Doc Lavoisier.
- Lapointe-VignolaC., (2002).** *Science et technologie du lait: transformation du lait*, Presses inter Polytechnique.
- Lamas E.M., Barros R.M., Balcão V.M., Malcata F.X., (2001).** Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enzyme MicrobTechnol.*, 28, pp:642-652.
- Lowry ON., Rosbdrough NJ., Farr AL., RandallRJ.,(1951).** Protein measurement th folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : (265-275) p.

## Les références bibliographiques

---

- Libouga, D., Vercaigne-MarkoD., Et Al ., (2006).** "Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*." *ropicult* **24**(4): 229-238.
- Lucey J., (2002).** CHEESE| Rennet Coagulation of Milk.
- Masfufatun.,(2009).** Isolasi dan karakterisasi enzim selulase.[http://fk.uwks.ac.id/archive/journal/vol.\[12 june 2019\]](http://fk.uwks.ac.id/archive/journal/vol.[12%20june%202019].).
- Mahaut M., Jeantet R., Brule G.,(2000).** *Initiation à la Technologie Fromagère.* TEC & DOC Lavoisier : Paris ; 194 p.
- Matieu J., (1998).**Initiation à la physicochimie du lait, Tec et Doc, 220p
- Mechakra A, Auberge B, Remeuf F and Lenoir J (1999) Optimisation.** d'un ilieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium amemberti*. *Sciences des aliments* 19:663-675.
- McmahonDj., Brown Rj., Richardson Gh., Ernstrom Ca.,(1984)b.** Effects of calcium, phosphate and bulk culture media on mil kcoagulation properties. *Journal of Dairy Science*, **67**: 930-938.
- McneillGp., DonnelyWj.,(1987).** Optimization of porous glass, chromatography for Size fractionation of bovine casein micelles.*Journal of DairyResearch*, **54**: 19-28.
- Mouranche, A., & Costes C., (1984).** Hydrolases et Dépolymérase (Enzymes d'intérêt 85 industrie). In *Biochimie Appliquée* (BORDAS). Paris.
- Moschopoulou, E., (2004).** Effect of extraction conditionq on the characteristics of he Traditional lambrennets Greek *Journal of Dairy Science &Technology*1:27-42
- Moutilla A., Balcones E., Olano A., Calvo Mm.,(1995).** Influence of heat treatments on whey protein denaturation and rennet clotting properties of cow's and goat's milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **43**: 1908-1911.
- Mietton B., Gaucheron F., Salaun F., (2004).** Minéraux et transformations fromagères. In *Minéraux et Produits Laitiers*, GAUCHERON F (ed). Lavoisier: Paris; 471-563.
- Najera Ai., De Renobales M., Barron Ljr(2003).** Effects of pH, temperature, CaCl<sub>2</sub>. and enzyme concentrations on the rennetclotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*, **80**: 345-352.

## Les références bibliographiques

---

- Nouani A., Belhamiche N., Slamani R., Fazouane F., Belbraouet S., Bellal M.M., (2009).** Purification et caractérisation électrophoretique d'une protéase coagulant le lait de *Mucor Pusillus* : comparaison de méthodes. *European Journal of Scientific Research*, 35 (4):512-52.
- Özer B, Akardere E, Çelem EB And Önal S., (2010).** Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato. *Biochemical Engineering Journal* 50:110-115.
- Ramet J.P., (1997)** .Les agents de transformation du lait; la présure et les enzymes coagulantes In: Le fromage. Ed., A. Eck, 3ème ed., Technique et documentation Lavoisier, p.101-107, 539p.
- Ramet J.P., (1997).** Les agents de transformation du lait in Le fromage, 3édition, Tech. &Doc. Paris, pp: 165-172.
- Rao, M. B., A. M. Tanksale, et al., (1998).** "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(3): 597-635.
- Remeuf F., Cossin V., Dervin C., Lenoir J., Tomassone R.,(1991).** Relation entre les caractères physicochimiques des laits et leur aptitude fromagère. *Lait*, **71**: 397-421.
- Reguieg A., Jidel M., (2018).** Distribution de système enzymatique (coagulase) dans le cardon (*Cynara cardunculus*).mémoire . Université Ziane Achour –Djelfa, p. 44-45
- Robitaille G, Lapointe C, Leclerc D and Britten M., (2012).** Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropéptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. *Journal of dairy science* 95:1-8.
- Schmidt D.G., (1982)** Association of caseins and casein micelle structure In: Developments of dairy chemistry 1-proteins. Ed., P. F. Fox, Applied science publishers TD, p. 61-86
- Seydi M., (2004).** Caractéristiques du lait cru. EISMV, laboratoire HIDAOA, 12p
- Silva S.V., And Malcata., F.X., (2005).** Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *cynaracardunculus* *Food Chemistry* 89 (2005) 19-26
- Sousa M.J., Malcata F.X., (2002).**Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara Cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*, 82, 151–170

## Les références bibliographiques

---

**Troch T., Lefebure É., Baeten V., Colinet F., Gengler N., Sindic M., (2017).** Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. BASE.Dec 20.

**Van Hooydonk Acm., Walstra P.,(1987).** Interpretation of the kinetics of The renneting reaction in milk. *Netherlands Milk Dairy Journal*, **41**: 19-47.

**Visser S. (1981).** Proteolytic enzymes and their action on *milk* proteins. *Neth. Milk Dairy J.*, **35**: 65-88.

**Vignola Cl.,(2002).***Science et Technologie du Lait. Transformation du Lait.* Fondation et Technologie Laitière du Québec. Presses Internationales Polytechnique: Québec; 600 p.

**Wahba A.A., And El-Abbasy F.M., (1984).** Studies on the use chicken pepsin on Domiati, cheese making. *Egyptian Journal of Dairy Science*. 12 (1) : 77-82.

**Yamamoto A., (1975).** Proteolytic enzymes In: *Enzymes in food processing*. Ed., G. Reed, 2 ème ed, Academic press p.124-179,573 p.

**Zoon P., Van Vliett T., Walstra P.,(1989).** Rheological properties of rennet- induced skim milk-gels. IV: The effect of pH and NaCl. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **43**: 17-34.

**(Anonyme1)**<https://www.myrteaformations.com/index.php?mod=aromatheque&act=fihe&ind=70>

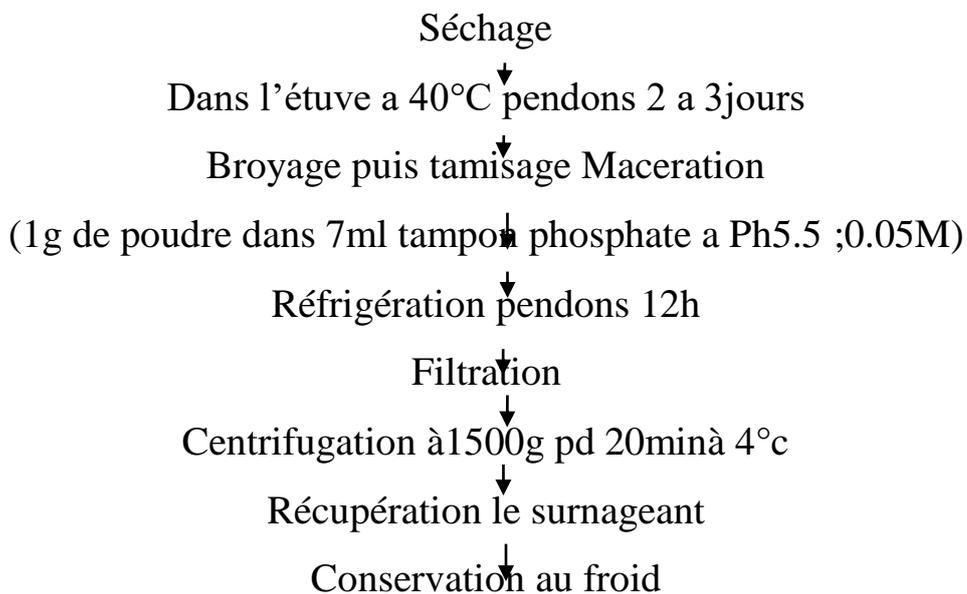
**(Anonyme2)**<http://www.tela-botanica.org/>

**(Anonyme3)**[https://site.plantesweb.fr/fleursdegascogne/1692/un\\_peu\\_de\\_botanique\\_.tm](https://site.plantesweb.fr/fleursdegascogne/1692/un_peu_de_botanique_.tm)

# *Annexes*

## Annexe I : Diagrammes d'extraction des enzymes dans le végétale

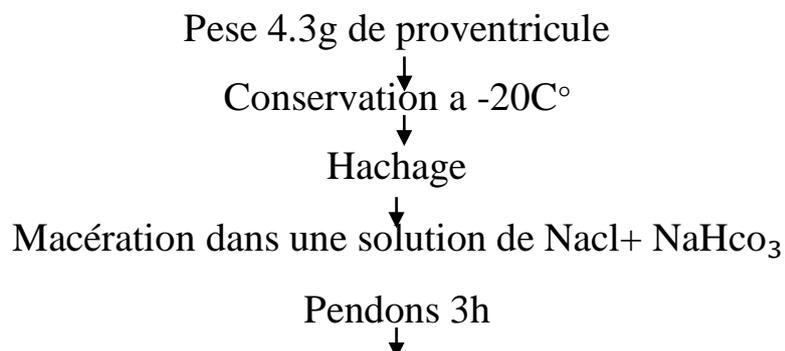
L'extraction des protéases permet la libération du contenu cellulaire, le protocole utilisé dans ce travail est particulièrement pour l'extraction des protéases végétales, c'est le cas des protéases *Galactites tomentosa*, *Cynaracadunculus*, *Pélargonium graveolens*.

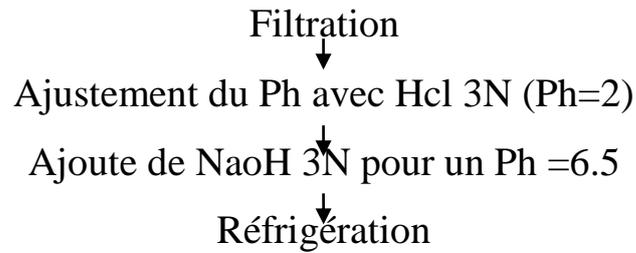


**Figure 01** : Obtention de l'extrait brut des fleurs du cardon et Galactite

## Annexe II Le diagramme d'extraction utilise dans cette étude

L'extraction de la pepsine de poulet est effectuée selon le diagramme décrit par BOHAK, (1970) Les étapes d'extraction de la pepsine de poulet sont décrites dans la figure





**Figure 02** : Diagramme d'extraction de la pepsine de poulet selon Bohak, 1970

## Annexe II : Dosage des protéines par la méthode (Bradford, 1976).

### II-1 Préparation de réactif de Bradford

- 10mg de bleu de Coomassie G-250 ;
  - 5 ml d'éthanol à 95% ;
  - 10 ml d'acide phosphorique à 85% ;
  - compléter avec l'eau distillée jusqu'à un volume de 100 ml ;
- Ce réactif doit être conservé à 4°C et à l'abri de la lumière.

### II-2 Elaboration de la courbe d'étalonnage des protéines

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumin bovine (BSA) (1mg/ml) selon des quantités suivantes : 0, 100, 200, 300, 400 et 500 µl.

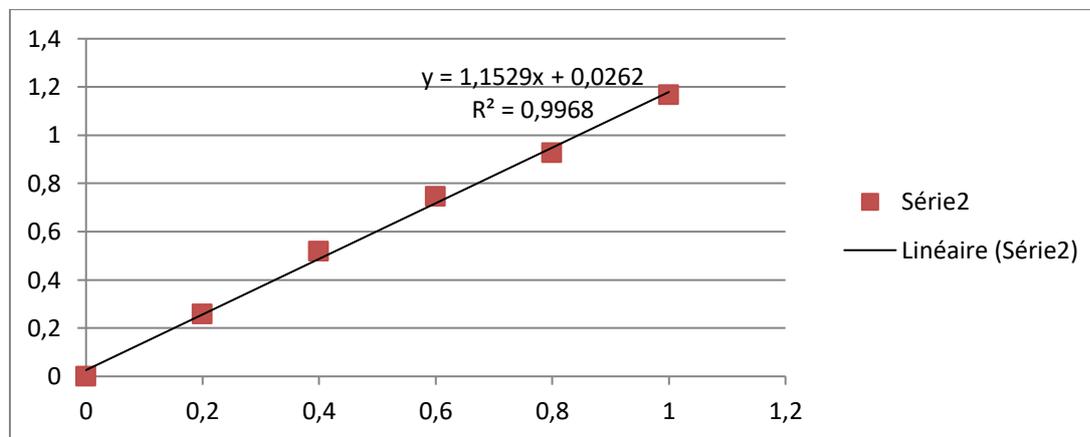
Toutes les dilutions des solutions protéiques sont effectuées en présence de l'eau distillée. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 500µl.

Après addition de 2ml du réactif de Bradford et agitation, la solution est laissée à l'obscurité 15min puis l'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc.

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

N° tube	Blanc	1	2	3	4	5
BSA (µl)	0	200	400	600	800	1000
Eau distillée (µl)	1000	800	600	400	200	0

<b>Total (µl)</b>	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Réactif Bradford (µl)</b>	2000					



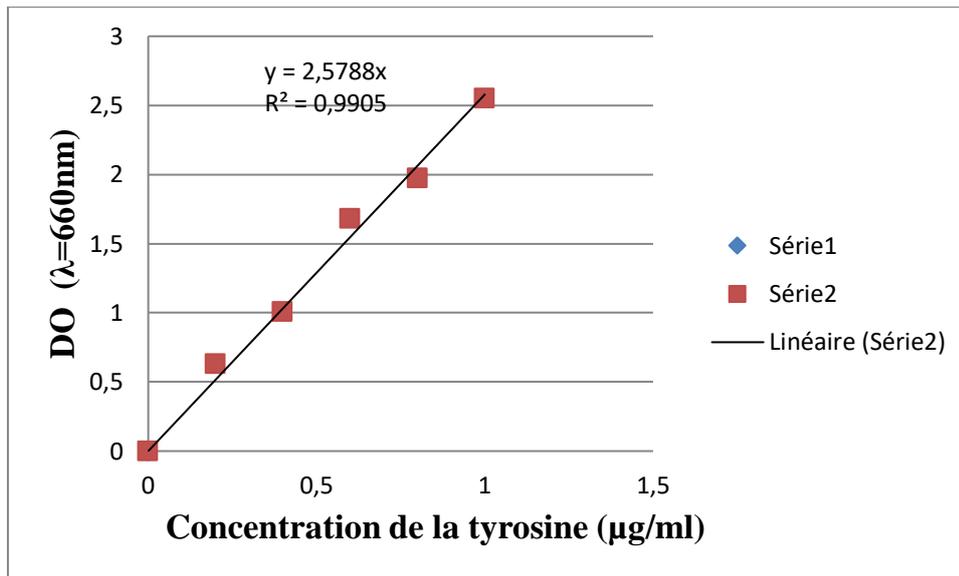
**Figure 1** : Courbe d'étalonnage de la solution de SAB (1 mg/mL) Bradford, (1976)

### Annexe III : mesure de l'activité protéolytique

#### III-1 Courbe d'étalonnage de la tyrosine

**Tableau II** : Préparation de la gamme d'étalonnage de la Tyrosine (250 µg/mL)

<b>N tube</b>	Blanc	1	2	3	4	5
<b>Dilution</b>	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
<b>Tyrosine (µL)</b>	0	100	200	300	400	500
<b>Tampon phosphate 0,1 M pH 7 (µL)</b>	500	400	300	200	100	0
<b>Solution C (mL)</b>	2,5					
Incubation à 35°C pendant 10 min,						
<b>Folin-Ciocalteu (µL)</b>	250					
Incubation à 35°C pendant 20 min,						
Lire l'absorbance à 660 nm						



**Figure 2 :** Courbe d'étalonnage obtenu avec la tyrosine

### Appareillage

#### Appareillage utilisé aux Laboratoires

- Balance de précision à 0,01g (SARTORIUS);
- Centrifugeuse (SIGMA) ;
- ph mètre (Hanna-instruments) ;
- Spectrophotomètre UV-Visible (SCHIMADZU, Japon) ;
- Bain marie
- Etuve
- Micropipettes
- Seringues
- Eppendorfs
- équipements de protection individuelle
- la verrerie (bêchers, fioles jaugées, pipette graduées, tubes à essais, tubes à centrifugation, ...)

## Résumé

L'objectif du présent travail est l'extraction et la caractérisation de protéases végétale de *Cynaracadunculus* ; *Galactite tamentosus* ; *Pelargonium graveolens* et la pepsine animal de la caille Montagnier et l'étude de la possibilité de leur emploi comme succédané de présure

La caractérisation physicochimique a permis de déterminer la teneur en protéine, l'activité et la force coagulante, l'activité protéolytique, des extraits enzymatiques obtenu.

Les résultats montrent que tous extrait enzymatique surtout *Pelargonium graveolens* ont des activités protéolytiques et coagulantes nettement supérieure à celle de la présure

L'étude de l'influence des paramètres physicochimiques du lait (pH, température, concentration en  $\text{CaCl}_2$  et de la concentration de l'extrait enzymatique), sur l'activité coagulante et protéolytique des protases végétales et de la pepsine animale et a été réalisée.

En conclusion, les caractéristiques de ces enzymes indiquent qu'elles peuvent être utilisées comme substitut de présure.

**Mots clés :** extraction, succédané de présure, coagulation, activités coagulantes et protéolytiques

## Abstract

The objective of this work is the extraction and characterization of plant protease from *Cynara cadunculus*; *Galactitetamentosus*; *Pelargonium graveolens* and animal pepsin from Montagnier quail and the study of the possibility of their use as a rennet substitute.

The physicochemical characterization made it possible to determine the protein content, the activity and the coagulant force, the proteolytic activity, of the enzymatic extracts obtained.

The results show that all enzymatic extracts especially *Pelargonium graveolens* have proteolytic and coagulant activities clearly superior to that of rennet.

The study of the influence of the physicochemical parameters of milk (pH, temperature,  $\text{CaCl}_2$  concentration and the concentration of the enzymatic extract), on the coagulant and proteolytic activity of plant protease and animal pepsin and was carried out.

In conclusion, the characteristics of these enzymes indicate that they can be used as a substitute for rennet.

**Key words :** extraction, rennet substitute, coagulation, coagulant and proteolytic activities